

**FILOGENETIK ULAR TANAH *Calloselasma rhodostoma* (Kuhl, 1824)
(SERPENTES: VIPERIDAE: CROTALINAE) BERDASARKAN ANALISIS
MORFOMETRI DAN DNA MITOKONDRIA (GEN ND4) DI ASIA TENGGARA**

TESIS

oleh

AHMAD MUAMMAR KADAFI

166090100111016



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN TESIS

**FILOGENETIK ULAR TANAH *Calloselasma rhodostoma* (Kuhl, 1824)
(SERPENTES: VIPERIDAE: CROTALINAE) BERDASARKAN ANALISIS
MORFOMETRI DAN DNA MITOKONDRIA (GEN ND4) DI ASIA TENGGARA**

AHMAD MUAMMAR KADAFI

166090100111016

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji

pada tanggal 17 Juli 2018

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Magister Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing I

Nia Kurniawan, S.Si., MP., D.Sc.
NIP. 19781025 200312 1 002

Pembimbing II

Dr. Amir Hamidy, M.Sc
NIP. 19781014 200502 1 002

Ketua Program Studi Magister Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Nia Kurniawan, S.Si., MP., D.Sc
NIP. 19781025 200312 1 002

SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS

Judul Tesis :

**FILOGENETIK ULAR TANAH *Calloselasma rhodostoma* (Kuhl, 1824)
(SERPENTES: VIPERIDAE: CROTALINAE) BERDASARKAN ANALISIS
MORFOMETRI DAN DNA MITOKONDRIA (GEN ND4) DI ASIA TENGGARA**

Nama : Ahmad Muammar Kadafi

NIM : 166090100111016

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Nia Kurniawan, S.Si., MP., D.Sc

Anggota : Dr. Amir Hamidy. M.Sc

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji I : Dr. Agung Pramana Warih M., M.Si

Dosen Penguji II : Dr. Bagyo Yanuwiadi

Tanggal Ujian : 17 Juli 2018

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam Naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (Magister) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 2 dan Pasal 70).

Malang, 17 Juli 2018



Nama : Ahmad Muammar Kadafi

NIM : 166090100111016

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

RIWAYAT HIDUP

Ahmad Muammar Kadafi, kelahiran Jember, 21 Mei 1993 adalah anak dari Bapak Imron Rosadi dan Ibu Sri Utami. Jenjang Pendidikan meliputi Sekolah Dasar (SD), Sekolah Menengah Pertama (SMP), dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di Jember, lulus pada tahun 2011. Studi lanjut Starta 1 (S-1) di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Brawijaya (UB), Malang dengan judul tugas akhir “Studi Morfologi Ular Tanah *Calloselasma rhodostoma* (Kuhl, 1824) di Indonesia. Pengalaman kerja sebagai asisten praktikum Sistematika Hewan, Biologi Sel pada saat menempuh S-1, dan Biosistematika Molekuler pada saat menempuh S-2. Pengalaman kerja meliputi asisten peneliti pada proyek penelitian *PEER Science* sejak 2013 sampai 2017, selain itu sebagai peneliti senior pada kegiatan *Operation Wallacea* (OpWall) 2017. Pengalaman organisasi yang masih aktif adalah Perhimpunan Toxinologi Indonesia melalui organisasi *RECS*, yang fokus pada kasus gigitan ular yang terjadi di Indonesia dan Perhimpunan Herpetologi Indonesia (PHI).

Malang, 17 Juli 2018

Penulis

Ahmad Muammar Kadafi

RINGKASAN

Filogenetik Ular Tanah *Calloselasma rhodostoma* (Kuhl, 1824) (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) berdasarkan Analisis Morfometri dan DNA Mitokondria (Gen ND4) di Asia Tenggara

Ahmad Muammar Kadafi, Amir Hamidy, Nia Kurniawan

Program Magister Biologi, Jurusan Biologi,

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

2018

Dinamika geologi yang berdampak pada perubahan topografi di Asia Tenggara (*Sundaland*) diduga bertanggung jawab penuh terhadap pola distribusi *Malayan Pit Viper* (*Calloselasma rhodostoma*) di Indonesia. Evaluasi terhadap terputusnya aliran gen sebagai dampak dari kondisi ini sangat penting dilakukan untuk menganalisis profil filogenetik, zoogeografi, dan waktu divergensi *C. rhodostoma* yang didukung melalui analisis DNA gen ND4 dan perbandingan morfologi. Sejumlah 23 sekuen sampel digunakan dalam konstruksi pohon filogenetik *Bayesian Inference* (BI), *p-distance*, dan waktu divergensi dari 7 lokasi di Asia Tenggara. Sebanyak 2 sekuen tambahan diambil dari *GenBank* dari Thailand dan 4 sekuen sampel sebagai *outgroup*. Spesies *C. rhodostoma* ditemukan kembali di Kalimantan Barat sejak sampel terakhir ditemukan tahun 1912, dengan habitat hutan dataran rendah, dan perkebunan sawit. Pengelompokan yang mengacu pada karakter morfologi dan topologi filogeni (politomi) menunjukkan pengelompokan masing-masing sampel berdasarkan lokalitas, dimana nilai *p-distance* rendah (minimum: 0.27%, maksimum: 0.39%), sehingga dapat disimpulkan bahwa spesies ini masih dalam satu spesies. Variasi morfologi ditunjukkan dengan adanya variasi sisik kepala, dimana terdapat dua variasi, yaitu 3 tipe variasi sisik aksesoris kecil dan 4 tipe variasi sisik anterior temporal. Hipotesis persebaran *C. rhodostoma* diketahui dari waktu pemisahan (*Divergence time*) antara masing-masing populasi sampel. Populasi *C. rhodostoma* tersebar pada Pleistosen (1.8 juta tahun yang lalu) dimulai dari populasi Jawa menuju populasi Kalimantan sekitar 1.2 juta tahun yang lalu, kemudian populasi Kalimantan berkembang menuju populasi Thailand dan populasi Kangean sekitar 1 juta tahun yang lalu. Sedangkan populasi Thailand dan Kangean terpisah sekitar 0.8 juta tahun yang lalu.

SUMMARY

Phylogenetic of Malayan Pit Viper *Calloselasma rhodostoma* (Kuhl, 1824) (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) as revealed by Morphometric Analysis and Mitochondrial DNA (ND4) in Southeast Asia

Ahmad Muammar Kadafi, Amir Hamidy, Nia Kurniawan

Biology Magister Program, Biology Department,

Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University

2018

The geological history of Southeast Asia is predicted to be responsible for the distribution pattern of Malayan Pit Viper (*Calloselasma rhodostoma*) in Indonesia. Evaluation on the disconnection of gene flow as the result of geological history is important to analyse phylogenetic, zoogeography, and time divergence of *C. rhodostoma* as revealed by mitochondrial DNA, ND4, and morphological analysis. Total of 23 sequences was analysed and used to construct phylogenetic tree with Bayesian Inference (BI), p-distance, and time divergence of *C. rhodostoma* from 7 locations in Southeast Asia. Two sequences originated from Thailand and 4 sequences as outgroup were downloaded from GenBank. *Calloselasma rhodostoma* is rediscovered in West Kalimantan since the first sample discovered in 1912. This snake is mostly found in lowland forest and palm plantation. The result of this research has discovered that *C. rhodostoma* grouped based on the locality, both according to morphological analysis or phylogenetic tree. In addition, p-distance score is considered as low (minimum: 0.27%, maximum: 0.39%), so it can be concluded that all samples used in this study still belong to the same species. Morphological variation is indicated by variation on the head scale, where there are 2 variations: 3 types of small accessories scales and 4 types of anterior temporal scale. According to the divergence them, the hypothesis for *C. rhodostoma* distribution is predicted to be spread in Pleistocene (1.8 mya) and originated from Java, then spread to Kalimantan in 1.2 mya. Kalimantan population was then predicted to develop and spread to Thailand and Kangean in mya. Thailand and Kangean population is estimated to be separated in 0.8 mya.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kehadiran Allah SWT, atas segala limpahan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga dapat menyelesaikan naskah Tesis yang berjudul “Filogenetik *Malayan Pit Viper* (*Calloselasma rhodostoma* Kuhl, 1824) (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) Berdasarkan Analisis Morfometri dan DNA Mitokondria (Gen ND4) di Asia Tenggara” dapat diselesaikan. Penelitian ini didanai oleh PEER Science USAID PROJECT “*Diversification and Inventory of the Lowland Herpetofauna of Java and Sumatra*”. Hormat dan ucapan terima kasih ditujukan kepada:

1. **Orang Tua Penulis, Bapak Imron Rosadi, Ibu Sri Utami, Laeli Rahmawati Rosadi, Rajjif Al Rasyid** dan semua kerabat keluarga penulis yang selalu mendukung, memberikan doa dan semangat dari awal sampai akhir masa perkuliahan penulis.
2. **Nia Kurniawan D.Sc.** dan **Dr. Amir Hamidy, M.Sc** selaku Dosen Pembimbing yang telah memberikan bimbingan, dedikasi dan motivasinya kepada penulis.
3. **Dr. Bagyo Yanuwiyadi** dan **Widodo Ph. D, Med.Sc** selaku Dosen Penguji, yang telah memberikan nasihat dan saran dalam menyelesaikan naskah Tesis penulis.
4. **Bapak/Ibu Dosen Biologi FMIPA UB**, yang telah memberikan ilmu selama penulis dalam masa perkuliahan.
5. **Muhamad Fahmi, M.Si., Bagus Priambodo, M.Si., dan Fitra Arya D. N, M.Si.,** yang telah meluangkan waktu untuk melakukan *review* terhadap penulisan Tesis penulis.
6. **Andi K. P. S.Si., Rifqi Ken Cahya S.Si., Ficky Prasetya P. P. S.Si., Bagus Priambodo, M.Si., Dwi H. Putro, S.Si., Abdi Firmansyah, S.Si., Rizky Darmawan, S.Si., Ahmad Febri P. S.Si., Anggun Sausan Firdaus, S.Si.,** sahabat seperjuangan saat kuliah di Jurusan Biologi.
7. **Grup peneliti herpetofauna NK Research** yang selalu membantu dalam banyak hal.
8. **Rekan-rekan S2 Biologi UB, serta seluruh civitas akademik Jurusan Biologi dan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Brawijaya.**

Penulisan Tesis ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga penulis sangat mengharapkan kritik dan saran pembaca sebagai penyempurnaan penulisan dan penelitian selanjutnya.

Malang, 17 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS	v
RIWAYAT HIDUP	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	viii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiv
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 5
2.1 Sejarah Geologi Paparan Sunda (<i>Sundaland</i>)	5
2.2 Spesiasi Fauna di Paparan Sunda (<i>Sundaland</i>)	11
2.3 Malayan Pit Viper, <i>Calloselasma rhodostoma</i> (Kuhl, 1824)	11
2.3.1 Status Taksonomi	11
2.3.2 Distribusi dan Ekologi	12
2.3.3 Morfologi <i>C. rhodostoma</i> Kuhl, 1824	13
2.4 Morfometri	14
2.5 Penanda Molekuler	17
2.6 Penelitian terkait <i>C. rhodostoma</i>	19
2.7 Analisis Filogenetik	20
2.8 Kerangka Konsep	21

BAB III METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Waktu dan Tempat.....	22
3.2 Kerangka Operasional.....	22
3.3 Langkah Penelitian.....	24
3.3.1 Koleksi Sampel.....	24
3.3.2 Pengukuran Morfometri dan Meristik.....	25
3.3.3 Ekstraksi DNA.....	27
3.3.4 Analisis Kualitatif Ekstraksi DNA.....	28
3.3.5 Amplifikasi PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	28
3.3.6 Sekuensing	29
3.4 Analisis Data Molekuler	29
3.4.1 <i>Contig</i> Sekuen <i>Forward</i> dan <i>Reverse</i>	29
3.4.2 Analisis Sekuen dari <i>GenBank</i> melalui BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>).....	29
3.4.3 <i>Alignment</i> Sekuen dan Jarak Genetis (<i>p-distance</i>).....	30
3.4.4 Rekonstruksi Pohon Filogeni BI (<i>Bayesian Inference</i>).....	30
3.4.6 Estimasi Waktu Divergensi (<i>Times Divergence</i>).....	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
4.1 Distribusi <i>C. rhodostoma</i> di Kalimantan.....	31
4.1.1 Deskripsi Spesimen <i>C. rhodostoma</i> dari Kalimantan Barat.....	32
4.1.2 Ekologi, Mangsa (<i>Prey</i>), dan Makanan (<i>Diet</i>) <i>C. rhodostoma</i> di Kalimantan Barat.....	34
4.2 Perbandingan Karakter Morfologi <i>C. rhodostoma</i> di Indonesia.....	36
4.2.1 Variasi Sisik Kepala	43
4.3 Nilai (<i>p-distance</i>) <i>C. rhodostoma</i>	49
4.4 Pohon Filogenetik <i>C. rhodostoma</i>	50
4.5 Estimasi Waktu Divergensi <i>C. rhodostoma</i>	52
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	55
5.1 Kesimpulan.....	55
5.2 Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN.....	67

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1 Perbandingan jumlah sisik (meristik) <i>C. rhodostoma</i> koleksi museum Leiden, Belanda	14
2 Daftar variabel karakter morfologi dan singkatan	15
3 Sampel ular <i>C. rhodostoma</i> yang digunakan dalam penelitian ini	25
4 Variabel karakter morfologi dan singkatan yang digunakan dalam penelitian..	26
5 Nilai pengukuran morfometri <i>C. rhodostoma</i> dari Kalimantan Barat (mm)	33
6 Perbandingan jumlah sisik (meristik) <i>C. rhodostoma</i> dari Kalimantan Barat ..	34
7 Presentase kontribusi mangsa <i>C. rhodostoma</i> di Jawa, Thailand Utara dan Thailand Barat (%)	35
8 Perbandingan jumlah nilai <i>factor loading</i> jantan dan betina pada dua komponen pertama (PC 1 dan PC2), hasil dari korelasi enam karakter <i>C. rhodostoma</i>	38
9 Perbandingan jumlah sisik ventral, subkaudal, supralabial, infralabial, dan dorsal <i>C. rhodostoma</i> diantara empat populasi di Indonesia	40
10 Data morfometri <i>C. rhodostoma</i> dari empat populasi. Data berupa rata-rata dan standard deviasi, diikuti <i>parentheses</i> . Semua pengukuran ditunjukkan dalam satuan millimeter (mm)	41
11 Tiga tipe variasi sisik aksesoris kecil <i>C. rhodostoma</i> di Indonesia dan sekitarnya	45
12 Empat tipe variasi sisik aksesoris kecil <i>C. rhodostoma</i> di Indonesia dan sekitarnya	46
13 Nilai p-distance (%) intraspesies populasi <i>C. rhodostoma</i> (range: minimum-maksimum)	50

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1 Wilayah Paparan Sunda (<i>Sundaland</i>) yang terdiri dari daratan Indo-China, Semenanjung Malaya, Sumatera, Jawa, Bali dan Pulau Palawan	5
2 Peta rekonstruksi Asia Tenggara dengan level permukaan air laut dibawah 50 m pada Pleistosen.....	6
3 Model rekonstruksi daratan dan lautan di kepulauan Indo-Australia pada Paleosen.....	7
4 Model rekonstruksi daratan dan lautan di kepulauan Indo-Australia pada Eosen	8
5 Model rekonstruksi daratan dan lautan di kepulauan Indo-Australia pada Oligosen	9
6 Model rekonstruksi daratan dan lautan di kepulauan Indo-Australia pada Miosen	9
7 Model rekonstruksi daratan dan lautan di kepulauan Indo-Australia pada Pliosen.....	10
8 Ular <i>C. rhodostoma</i> (Kuhl, 1824).....	12
9 Peta lokasi pengambilan sampel <i>C. rhodostoma</i> di Indonesia dan sekitarnya...	24
10 Peta wilayah observasi di Kalimantan Barat, Indonesia. <i>Insert</i> peta menunjukkan lokasi penemuan <i>C. rhodostoma</i> di Ketapang, Kalimantan Barat.	31
11 Spesies <i>C. rhodostoma</i> dari Kendawangan, Kalimantan Barat, Indonesia.....	33
12 Grafik <i>Principal Component Analysis</i> dari komponen 1 (PC1) dan komponen 2 (PC2) pada empat populasi <i>C. rhodostoma</i>	37
13 Variasi sisik aksesoris kecil pada sisik kepala <i>C. rhodostoma</i> (a); dan variasi penggabungan pada sisik anterior temporal dan temporal.....	44
14 Tiga tipe variasi sisik aksesoris kecil <i>C. rhodostoma</i> dan persebarannya	47
15 Empat tipe variasi sisik anterior temporal <i>C. rhodostoma</i> dan persebarannya..	48
16 Pohon filogenetik <i>Bayesian Inference</i> (BI) ular <i>C. rhodostoma</i> menggunakan gen ND4.....	51
17 Waktu divergensi ular <i>C. rhodostoma</i> yang dikonstruksi menggunakan <i>relaxed normal clock Bayesian</i> dengan 95% <i>credible interval</i>	53
18 Arah persebaran ular <i>C. rhodostoma</i> di Indonesia dan sekitarnya.....	54

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Keterangan
%	: Persen
AFLP	: <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
BI	: <i>Bayesian Inference</i>
C3SL	: Jumlah sisik antara sisik ke-3 supralabial dan subokular
C45SL	: Jumlah sisik antara sisik ke-4 dan ke-5 supralabial dan subokular
C4SL	: Jumlah sisik antara sisik ke-4 supralabial dan subokular
Can	: Sisik <i>canthal</i> (sisik antara internasal dan subokular)
Cep	: Sisik <i>chepalic</i> (sisik pada garis antara tengah Supraocular)
CITES	: <i>The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora</i> , atau <i>Washington Convention</i>
COI	: <i>Cytochrome Oxidase Unit 1</i>
COLEF	: Warna mata pada betina
COLEM	: Warna mata pada jantan
CPOST	: Pewarnaan pada coreng postokular
CSupOC	: Jumlah sisik yang bersentuhan langsung dengan sisik supraokular
CVEL	: Susunan warna pada coreng postokular
Cytb	: <i>Cytochrome b</i>
DBB	: Adanya pita gelap pada tubuh
DEL	: Jarak sisi bawah mata sampai dengan bibir
DEN	: Jarak antara anterior mata dan nostril
DEN/HL	: Rasio jarak mata ke nostril dibagi dengan panjang kepala
DEP	: Jarak antara anterior mata dan loreal pit
DEP/DEN	: Rasio jarak mata ke pit organ dibagi dengan jarak mata ke nostril
DEP/HL	: Rasio jarak mata ke pit organ dibagi dengan panjang kepala
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DSR	: Baris sisik dorsal
H3SL	: Tinggi sisik ke-3 supralabial
H4SL	: Panjang sisik ke-4 supralabial
HED	: Diameter horizontal mata
HeSc	: Sisik kepala (sisik pada baris longitudinal antara internasal dan batas leher)

HKY	: Hasegawa Kishino Yano
HL	: Panjang kepala
IL	: Sisik infralabial
InN	: Sisik internasal
IUCN	: <i>International Union for Conservation of Nature and Natural Resources</i>
KMSR	: Lunas dari baris sisik dorsal pada tengah tubuh
KOcc	: Lunas pada sisik oksipital
KTem	: Lunas pada sisik temporal
L3SL	: Panjang sisik ke-3 supralabial
L3SL/HL	: Rasio panjang sisik ke-3 supralabial dibagi panjang kepala
LGM	: <i>Last Glacial Maximum</i>
LSupOc	: Panjang sisik supraokular
LSupOc/WSupOc	: Rasio panjang sisik supraokular dibagi dengan lebar sisik supraokular
MAS	: <i>Marker Assisted Selection</i>
MCMC	: <i>Monte Carlo Markov Chain</i>
ML	: <i>Maximum Likelihood</i>
MSR	: Baris sisik dorsal pada tengah tubuh
Mya	: <i>Million years ago</i>
NASR	: Jumlah dari baris sisik dorsal belakang kepala
NCep	: Jumlah dari sisik <i>chepalic</i> pada garis antara sisik supraokular
ND4	: <i>NADH dehydrogenase 4</i>
NHeSc	: Jumlah dari sisik kepala secara longitudinal
NInN	: Jumlah sisik yang terpisah pada internasal
NMSR	: Jumlah dari baris sisik dorsal pada tengah tubuh
NPSR	: Jumlah dari baris sisik dorsal sebelum kloaka
NSC	: Jumlah dari sisik subkaudal
NSnSc	: Jumlah sisik pada ujung mulut atau moncong
NVEN	: Jumlah dari sisik ventral
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
p-distance	: <i>pairwise distance</i>
POSTF	: Adanya coreng pada postokular betina
POSTM	: Adanya coreng pada postokular jantan

RAPD	: <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RFLP	: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SC	: Sisik subkaudal
SL	: Sisik supralabial
SnL	: Panjang ujung mulut (dari ujung rostral sampai ke anterior mata)
SnL/HL	: Rasio jarak ujung mulut dibagi dengan panjang kepala
SNP	: <i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SnSc	: Sisik ujung mulut (moncong) (sisik pada garis antara internasal dan garis yang menghubungkan bagian anterior mata)
SVL	: Panjang ujung mulut sampai dengan kloaka
TaL	: Panjang ekor
Tal/TL	: Rasio jarak ekor dibagi dengan panjang total
TAP	: Pola pada ekor
Tem	: Sisik temporal
TL	: Panjang total
TNIL	: Jumlah total dari sisik infralabial
TNSL	: Jumlah total dari sisik supralabial
VED	: Diameter vertikal mata
VED/DEL	: Rasio diameter mata secara vertikal dibagi dengan jarak mata dengan sisi
VELSF	: Adanya sebuah garis ventrolateral pada betina
VELSM	: Adanya sebuah garis ventrolateral pada jantan
VEN	: Sisik ventral
VSb	: Adanya garis putih pada area vertebral
WInN	: Lebar dari sisik internasal (rata-rata)
WInN/WSupOc	: Rasio lebar sisik internasal dibagi dengan lebar sisik supraokular
WSupOc	: Lebar sisik supraokular

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Biodiversitas Indonesia (flora dan fauna) yang melimpah dipengaruhi oleh kondisi Indonesia yang memiliki 2 *hotspot* prioritas konservasi, yaitu *Sundaland* dan *Wallacea* (Mittermeier dkk., 1999; Myers dkk., 2000). Dua *hotspot* tersebut memberikan dampak pada perbedaan komposisi biodiversitas yang menarik di Indonesia (Iskandar dan Erdelen, 2016). Myers dkk. (2000), mengemukakan bahwa jumlah reptil di wilayah *Sundaland* mencapai 431 spesies dan sebanyak 268 diantaranya merupakan spesies endemik, sedangkan pada wilayah *Wallacea* mencapai 188 spesies dan 122 diantaranya endemik. Dari total 431 spesies reptil yang terdapat di wilayah *Sundaland* tersebut, terdapat sebanyak 341 spesies ular yang terdistribusi merata di kawasan Indonesia (Jawa, Sumatera, dan Borneo) (Inger dan Voris, 2001).

Proses evolusi yang terjadi di wilayah *Sundaland*, khususnya yang terjadi di Indonesia, diyakini memiliki peranan penting pada distribusi beberapa jenis ular di Indonesia. Evolusi *Sundaland* (Indonesia) mengakibatkan munculnya *Ring of Fire* di wilayah Indonesia, erupsi Toba, dan barrier ekologi yang mengakibatkan terputusnya aliran gen dan terjadinya mutasi pada ular yang didukung oleh pengaruh lingkungan yang berbeda. Penelitian tentang ular sebelumnya di wilayah *Sundaland* mampu menghasilkan temuan spesies baru, salah satunya adalah genus *Trimeresurus* (*Popeia*) famili Viperidae, yang berasal dari Sumatera (Malhotra dan Thorpe, 2004). Spesies baru dalam beberapa dekade ini yang sudah dideskripsikan dari Sumatera, Borneo, dan Semenanjung Malaya seperti *Trimeresurus* (*Popeia*) *toba* (David, Petri, Vogel & Doria, 2009) *Trimeresurus* (*Popeia*) *sabahi* (Regennas & Kramer, 1981) *Trimeresurus* (*Popeia*) *barati* (Regennas & Kramer, 1981), *Trimeresurus* (*Popeia*) *buniana* (Grismer & McGuire, 2006) adalah beberapa bukti ilmiah lain dari dampak adanya dinamika perubahan topografi daratan *Sundaland* dimana keempat spesies tersebut memiliki bentuk morfologi yang berbeda satu sama lain. Namun, berdasarkan data analisa genetik, keempat spesies tersebut merupakan satu spesies yang sama (Wostl dkk., 2016).

Penggunaan marka molekuler sebagai salah satu alat dalam analisis filogenetik sudah sangat banyak dilakukan, salah satunya adalah DNA mitokondria. DNA mitokondria sangat baik digunakan sebagai analisis hubungan kekerabatan, dan evolusi populasi, dikarenakan DNA

mitokondria hanya diturunkan oleh indukan betina, memiliki laju mutasi yang tinggi, dan jumlah yang melimpah. Marka DNA mitokondria yang sering digunakan dalam analisis filogenetik ular adalah gen COI, ND4, dan Cytb (Malhotra dan Thorpe, 2004; Wuster dkk., 2008; Pyron dkk., 2013, Wostl dkk., 2016).

Evaluasi terhadap taksonomi ular di *Sundaland* yang didukung dengan analisa morfologi dan genetik perlu dilakukan untuk mengetahui kemungkinan terjadinya perubahan status taksonominya. Salah satu jenis ular yang terdistribusi luas di Indonesia adalah Ular Tanah *Calloselasma rhodostoma*. Secara ekologi, jenis ular ini terdistribusi dari daratan Asia Tenggara (Vietnam, Kamboja, Laos, Thailand, Malay Peninsula dan Indonesia) (Uetz dan Hillermann, 2018). Persebaran di Indonesia meliputi Jawa, Pulau Karimunjawa, dan Pulau Kangean (Das, 2010), namun pada tahun 2016, terdapat informasi tentang distribusi terbaru *C. rhodostoma* di Ketapang, Kalimantan Barat. Habitat *C. rhodostoma* di Indonesia yaitu pada hutan dataran rendah dengan tipe habitat semak-semak, hutan jati, perkebunan, persawahan, dan kawasan pemukiman (Das, 2010).

Ular Tanah *C. rhodostoma* merupakan salah satu jenis ular berbisa yang menyebabkan banyak kasus gigitan ular, khususnya di Asia Tenggara (Daltry dkk., 1996). Oleh sebab itu, ular ini sering kali dibunuh oleh penduduk karena dianggap membahayakan jiwa. Pemanfaatan ular ini sampai sekarang masih belum banyak diketahui. Secara ekologi, ular memberikan dampak positif terhadap ekosistem, yaitu sebagai kunci keseimbangan lingkungan. Posisi ular sebagai predator berada pada susunan pertengahan, dimana selain berperan sebagai predator, ular juga berperan sebagai sumber makanan untuk predator lain yang memangsa ular. Kondisi ini memberikan dampak positif terhadap ekosistem alami tetap bekerja. Ular sebagai predator menentukan tinggi rendahnya populasi hewan tertentu yang menjadi mangsanya pada suatu area (contoh umumnya tikus). Selain sebagai predator, ular juga merupakan mangsa bagi predator lain, seperti elang, burung hantu dan mamalia karnivora seperti macan *bobcats*. Fungsi ekologis ini sebenarnya sangat menguntungkan Indonesia yang memiliki area pertanian yang luas. Pemanfaatan lain dari ular adalah pemanfaatan *venom* yang diproduksi oleh ular tersebut sebagai bahan utama dalam pembuatan *anti-venom* untuk jenis ular ini. Selain itu, *venom* dari *C. rhodostoma* dapat dijadikan sebagai sumber bioprospektif dari *venom* tersebut, yaitu sebagai obat pemecah pembekuan darah, dan anti kanker.

Penelitian yang terkait dengan Ular Tanah *C. rhodostoma* saat ini berfokus pada protein bisa ular (*venom*) (Daltry dkk., 1996; Ponnudurai dkk., 1994; Huang dkk., 1995), variasi makanan yang dimangsa (Daltry dkk., 1998), perilaku bersarang (Hill dkk., 2006), kasus gigitan ular yang disebabkan oleh jenis ular ini (Warrel, 1986), dan deskripsi spesies baru dari jenis ular ini oleh Hoser (2018). Evaluasi secara menyeluruh tentang kekerabatan spesies *C. rhodostoma* di Asia Tenggara perlu dilakukan melalui analisa morfologi dan molekuler, sehingga hasil yang didapatkan diharapkan dapat mengevaluasi status taksonominya menjadi relevan, khususnya di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, beberapa rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana status kekerabatan intra-spesies pada *C. rhodostoma* ditinjau dari analisis morfologi dan filogenetik di Indonesia.
2. Bagaimana keterkaitan hubungan perubahan daratan *Sundaland* pada distribusi dan kekerabatan *C. rhodostoma*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengevaluasi status hubungan kekerabatan ular *C. rhodostoma* ditinjau dari analisis morfologi dan filogenetik di Indonesia.
2. Mengestimasi waktu pemisahan intra-spesies ular *C. rhodostoma* dengan perubahan daratan di *Sundaland*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi terbaru terkait distribusi *C. rhodostoma* ditinjau dari aspek ekologi.
2. Menambah data morfologi (taksonomi) dan data terbaru filogenetik *C. rhodostoma* berdasarkan marka molekuler, khususnya di Indonesia.

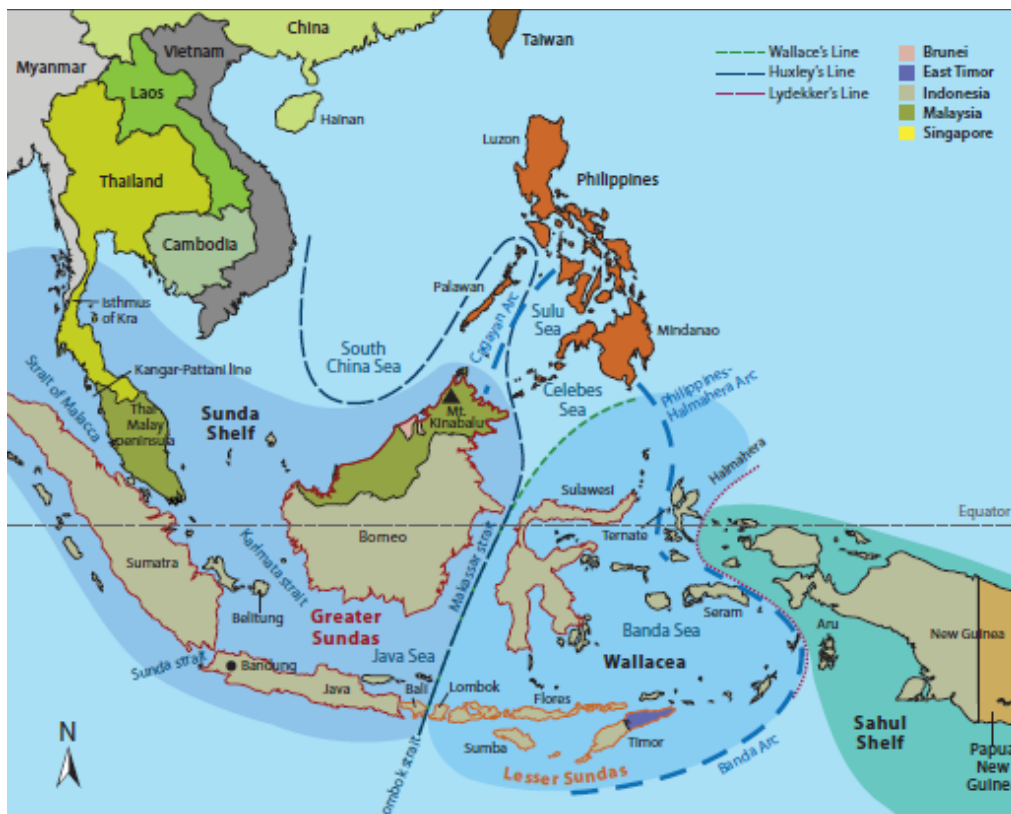
3. Memberikan informasi terkait hubungan kekerabatan *C. rhodostoma* dan evolusi distribusinya di Indonesia.
4. Memberikan sumbangsih dalam *database genetic*, khususnya spesies *C. rhodostoma* yang terdapat di Indonesia.
5. Referensi ilmiah dalam bidang konservasi reptilia dalam konteks peraturan perlindungan satwa dan strategi konservasi khususnya spesies *C. rhodostoma*. Hal ini berhubungan dengan status perlindungan ular *C. rhodostoma* pada IUCN, CITES, dan status apendik, sehingga diharapkan dapat berdampak positif dalam pemanfaatannya.
6. Sebagai dasar pengembangan antibisa ular yang spesifik pada spesies *C. rhodostoma* mengacu pada perbedaan genetik di Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Sejarah Geologi Paparan Sunda (*Sundaland*)

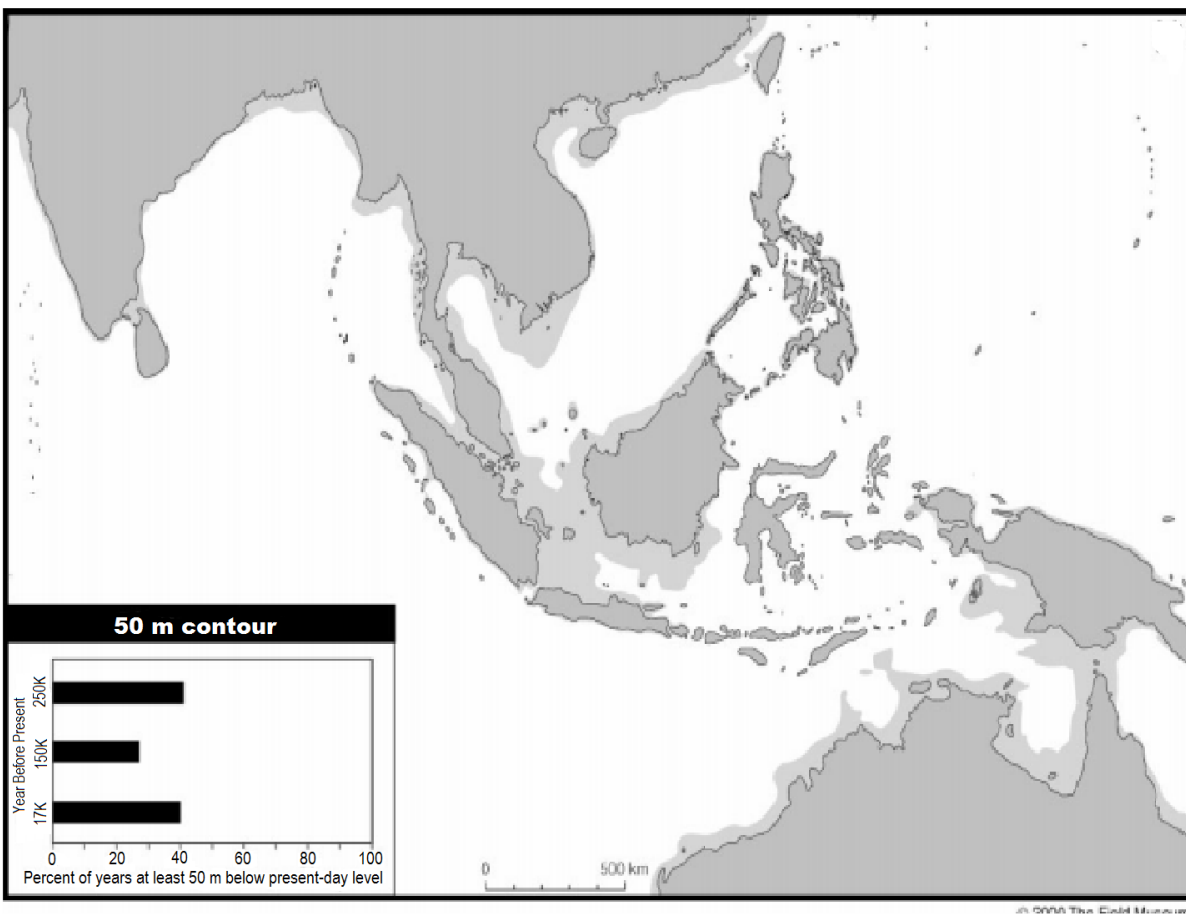
Paparan Sunda (*Sundaland*) merupakan wilayah di Asia Tenggara yang terdiri dari Indo-China, Semenanjung Malaya, Sumatera, Borneo (Kalimantan), Jawa, Bali, dan Pulau Palawan (Gambar 1), yang terpisah oleh lautan (Lohman dkk., 2011; Wilting dkk., 2012). Proses terpisahnya pulau-pulau tersebut diduga terjadi pada era Paleozoik dan Mesozoik dari daratan yang terbentang luas (Gonwana) (Molengraaf, 1916; Hall, 2013). Lebih spesifik lagi, menurut Lohman dkk., (2011), pemisahan terjadi pada *epoch* Paleosen (60 juta tahun lalu), akhir Eosen (40 juta tahun lalu), pertengahan Oligosen (30 juta tahun lalu), awal Miosen (20 juta tahun lalu), akhir Miosen (10 juta tahun lalu), dan awal Pliosen (5 juta tahun lalu) (Gambar 2).



(Hall, 2013)

Gambar 1. Wilayah Paparan Sunda (*Sundaland*) yang terdiri dari daratan Indo-China, Semenanjung Malaya, Sumatera, Jawa, Bali dan Pulau Palawan.

Tahapan perubahan wilayah Paparan Sunda juga dipengaruhi oleh adanya tahapan naiknya permukaan air laut yang terjadi antara 21.000 juta tahun yang lalu dan 4.200 juta tahun yang lalu. Hal ini diinisiasi oleh adanya fase terminal dari tingkat rendahnya permukaan air laut pada *Last Glacial Maksimum* (LGM) (sekitar -116 mbpl) yang terjadi sekitar 21.000 tahun yang lalu, yang diikuti naiknya permukaan laut sekitar -56 mbpl pada 11.000 tahun yang lalu (Hanebuth dkk., 2000; Solihuddin, 2014). Sementara itu, beberapa gambaran lainnya menjelaskan bahwa fluktuasi air laut hingga saat ini terjadi pada pertengahan dan akhir *epoch* Holosen (Geyh dkk., 1979; Tjia, 1996; dan Hesp dkk., 1998).

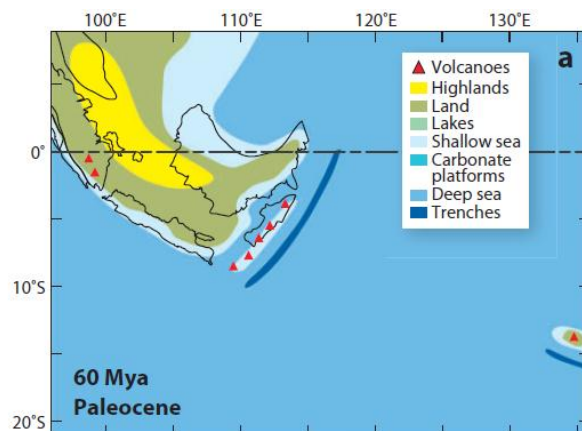


(Voris, 2000)

Gambar 2. Peta rekonstruksi Asia Tenggara dengan level permukaan air laut dibawah 50 m pada *epoch* Pleistosen.

Paleosen terjadi pada sekitar 60 juta tahun yang lalu. Pada *epoch* tersebut, daratan *Sundaland* belum mengalami pemisahan daratan (Gambar 3) seperti pada saat ini (Lohman dkk.,

2011). Ali dan Aitchison (2008) mengusulkan bahwa dalam masa Paleosen, daratan India bertabrakan dengan bagian daratan Sumatera, sebelum terjadinya tabrakan daratan India-Asia. Tetapi Hall (2013), tidak melihat adanya bukti secara geologi. Di sisi lain, bukti adanya tabrakan tersebut dapat ditemukan pada saat ini, dan kemungkinan besar tabrakan tersebut memberikan bukti adanya rute persebaran fauna ke wilayah bagian barat *Sundaland* yang terjadi jauh sebelum menyatunya daratan India ke Asia. Pada saat Paleosen, sebagian besar *Sundaland* mengalami kemunculan pada beberapa daerah dengan tingkat yang relatif tinggi, dimana terdapat deretan gunung api pada bagian timur *Sundaland* yang diproyeksikan sebagai daerah Sulawesi Barat (Hall, 2013). Iklim pada Paleosen sampai dengan awal Eosen (sekitar 56 juta tahun yang lalu) adalah mirip atau lebih hangat dan lebih basah dari saat ini (Heaney, 1991; Morley, 2000).

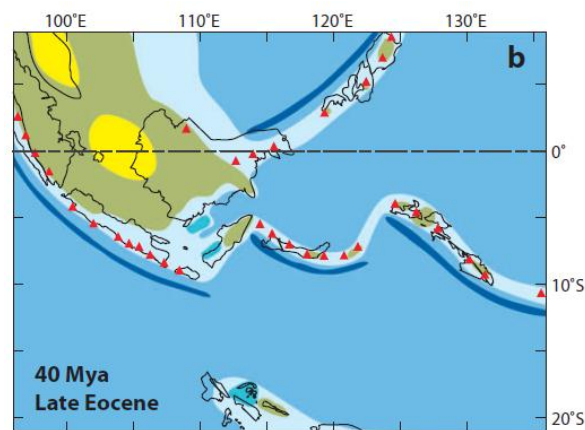


(Lohman dkk., 2011)

Gambar 3. Model rekonstruksi daratan dan lautan di kepulauan Indo-Australia pada Paleosen.

Eosen terjadi sekitar 50 juta tahun yang lalu (Hall, 1996), *epoch* ini juga diprediksi sebagai awal terjadinya perubahan yang besar pada daratan Asia, khususnya Paparan Sunda (Hall, 2002). Beberapa peristiwa yang terjadi pada *epoch* Eosen antara lain Pulau Palawan dan Pulau Luzon terpisah sejauh 1.300 km, namun saat ini kedua pulau tersebut hanya terpisah tidak lebih dari 300 km. Peristiwa lainnya adalah daratan India yang mengalami pergerakan ke arah utara dengan cepat pada periode *Cretaceous* dan mengalami tabrakan dengan Asia pada periode Paleogen. Pada saat yang sama, busur Sunda membentang dari Sumatera, melalui Jawa dan bagian lengan utara Sulawesi dan terus menuju ke Pasifik bagian barat untuk bergabung dengan busur Filipina-Halmahera. Pada awal *epoch* Eosen suhu maksimum hampir sama dengan *epoch* Paleosen, tetapi

pada pertengahan Eosen (45 juta tahun yang lalu) dan seterusnya, diperkirakan musim lebih bervariasi dan mungkin lebih kering sampai dengan periode Neogen (23 juta tahun yang lalu). Sebagian besar penelitian yang menggolongkan taksa Sulawesi dengan taksa dari Asia menyarankan persebaran dispersal yang diperkirakan terjadi dari *epoch* Miosen hingga Plio-Pleistosen (Muller dkk., 2010). Beberapa penelitian memperkirakan bahwa waktu divergensi taksa Sulawesi berasal dari barat melalui persebaran *vicariance*. Hal tersebut memungkinkan untuk terjadi melalui terbukanya Selat Makassar sekitar 45 juta tahun yang lalu pada *epoch* Eosen (Hall, 2009).



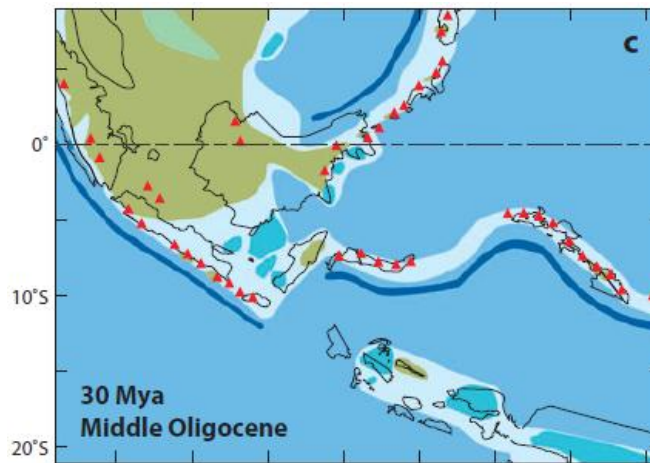
(Lohman dkk., 2011)

Gambar 4. Model rekonstruksi daratan dan lautan di kepulauan Indo-Australia pada *epoch* Eosen.

Oligosen terjadi sekitar 30 juta tahun yang lalu (Lohman, 2011). Pada Oligosen, Indocina, Burma, Semenanjung Malaysia, Jawa, Sumatera, dan Kalimantan masih merupakan satu kontinental sampai mengalami perubahan pada akhir Oligosen (25 juta tahun lalu). *Epoch* Oligosen merupakan *epoch* terjadinya penurunan level tanah yang dimulai sejak Paleosen. Pada *epoch* Oligosen diyakini sebagai salah satu *epoch* waktu perpindahan satwa khususnya pada fauna amfibia (Tjong dkk., 2010).

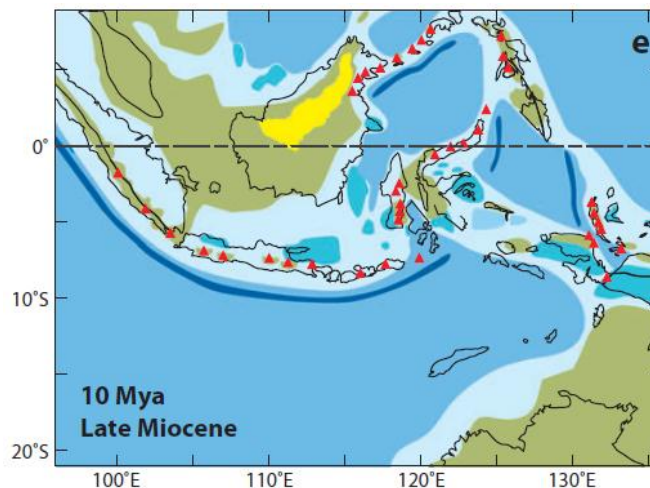
Miosen terjadi sekitar 10 juta tahun yang lalu, dimana terjadi perubahan pada wilayah *Sundaland*, khususnya terbentuknya sebagian pulau Sumatera. Pada awal Miosen (sekitar 23 juta tahun yang lalu), lempeng Australia mengalami tabrakan dengan tepi *Sundaland* yang terendam di dekat Sulawesi, dan wilayah Sunda mulai berputar sejalan dengan gerakan bagian utara

Australia (Lohman, 2011). Munculnya pegunungan dan perubahan sirkulasi laut kemungkinan merupakan penyebab terjadinya perubahan iklim di *Sundaland* yang biasanya basah. Lebih dari itu, peristiwa tersebut juga mempengaruhi iklim, baik regional maupun secara global, dengan perubahan pada pola arus samudera dan distribusi relatif darat dan laut (Morley, 2000). Iklim global yang lembab dan hangat mengalami puncak pada pertengahan Miosen 17-15 juta tahun yang lalu (Zachos dkk., 2001).



(Lohman dkk., 2011)

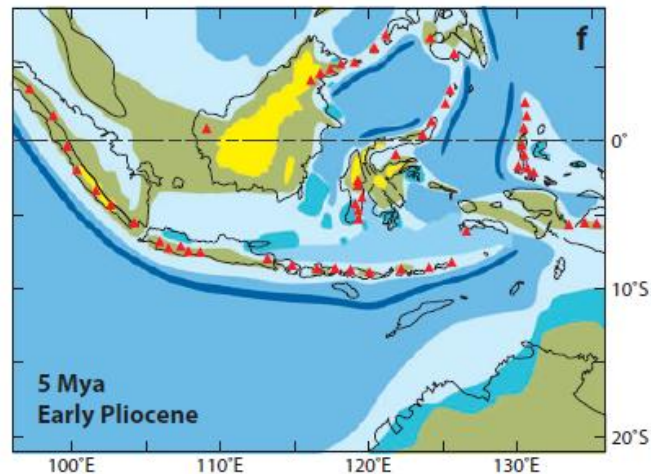
Gambar 5. Model rekonstruksi daratan dan lautan di kepulauan Indo-Australia pada *epoch* Oligosen.



(Lohman dkk., 2011)

Gambar 6. Model rekonstruksi daratan dan lautan di kepulauan Indo-Australia pada *epoch* Miosen.

Pliosen terjadi sekitar 5 juta tahun yang lalu, dimana Australia terus bergerak ke utara. Deformasi yang berhubungan dengan subduksi menyebabkan munculnya Sumatera dan Jawa secara bertahap sebagai dataran utama selama *epoch* Pliosen. Selain itu, terjadi peristiwa naiknya dataran Kalimantan secara bertahap di wilayah perairan dangkal dan pengurangan luas lahan di *Sundaland* selama *epoch* Neogen sampai Pliosen (Lohman, 2011). Iklim global dan regional perlahan mengalami perubahan menjadi lebih dingin dan kering, tetapi tetap relatif hangat dan lembab sampai sekitar 5 juta tahun yang lalu (Morley, 2000; Woodruff, 2010). Diversifikasi pada *epoch* Neogen sebelumnya telah dilaporkan dalam berbagai taksa tanaman dan hewan yang menunjukkan kemungkinan riwayat *vicariant* yang disebabkan oleh isolasi selama *epoch* Pliosen (Gorog dkk., 2004; Molengraaff dan Weber, 1921).



(Lohman dkk., 2011)

Gambar 7. Model rekonstruksi daratan dan lautan di kepulauan Indo-Australia pada *epoch* Pliosen.

Sejarah geologi yang unik ini memberikan dampak yang signifikan terhadap pola distribusi fauna di daratan Paparan Sunda, sehingga memberikan daya tarik tersendiri untuk mempelajari fauna yang terdapat pada kawasan tersebut. Beberapa aspek yang mendapat pengaruh dari sejarah geologi Paparan Sunda adalah adanya spesiasi pada fauna yang diakibatkan adanya barrier ekologi sehingga terjadi putusnya aliran gen pada fauna di wilayah Paparan Sunda (Inger dan Voris, 2001). Pulau Jawa dan Sumatera merupakan salah contoh pulau yang memiliki sejarah geologi yang kompleks dan terletak pada dataran gunung berapi, beberapa masih aktif dan

memiliki sejarah erupsi yang besar yang dijuluki cincin api (*Ring of Fire*) (Mayr, 1944; Wilting dkk., 2012). Paparan Sunda memiliki dua cincin api, deretan cincin api yang pertama terbentang dari Sumatera, Jawa, dan Banda, sedangkan yang kedua terbentang dari Maluku utara (Mayr, 1944). Beberapa catatan menyatakan bahwa sejarah erupsi gunung berapi yang sangat besar terjadi pada 73000-75000 tahun yang lalu di Sumatera, yaitu erupsi *supervolcano* Toba. Erupsi tersebut diprediksi sebagai erupsi terbesar kedua sepanjang sejarah dan memberikan dampak yang besar pada sistem flora dan fauna, terlebih lagi kepunahan pada beberapa spesies (Wilting dkk., 2012), salah satunya adalah Banteng Sumatra (Louys dan Meijaard, 2010). Erupsi tersebut juga menyebabkan fenomena langit yang gelap akibat dari abu yang tersebar ke stratosfer, serta menyebabkan iklim lebih dingin dan terjadinya migrasi pada beberapa spesies. Setelah masa erupsi berakhir, iklim kembali menjadi hangat dan menyebabkan reimmigrasi spesies pada habitat sebelumnya (Rampino dan Ambrose, 2000).

1.2 Spesiasi Fauna di Paparan Sunda (*Sundaland*)

Teori spesiasi yang banyak dipelajari sebagian besar berfokus pada populasi tanaman dan hewan dengan lingkup spesiasi simpatrik dan alopatrik. Spesiasi diartikan sebagai proses evolusi yang ditandai dengan munculnya spesies baru (Singh, 2012). Mayr dan Ashlock (1991) mengelompokkan spesiasi menjadi enam model yaitu poliploidi, simpatrik, parapatric, geografi atau alopatrik (tipe dikopatrik dan peripatrik), dan spesiasi waktu. White (1978) menyatakan bahwa pada proses spesiasi terdapat tiga variabel utama yang terlibat, yaitu mekanisme genetik yang menyebabkan keragaman genetik, mekanisme isolasi genetik yang mengarah ke asal muasal isolasi reproduksi, dan komponen geografi area termasuk adanya alopatrik dan absennya simpatrik.

Dasar landasan tersebut sangat ideal jika diterapkan pada topografi Paparan Sunda saat ini yang memungkinkan terjadinya proses spesiasi (Kurniawan dkk., 2015). Beberapa penelitian selama satu dekade terakhir mampu menunjukkan adanya spesiasi pada beberapa fauna di *Sundaland* seperti pada amfibi, yaitu spesies baru *Limnonectes hikidai* (Matsui dan Nishikawa, 2014), *Limnonectes cintalubang* (Matsui dkk., 2014) dari Borneo (Kalimantan); pada mamalia yaitu spesies baru orang utan dari Tapanuli, Sumatera *Pongo tapanuliensis* (Nater dkk., 2017); pada reptil yaitu jenis baru pada ular dari famili Natricine, genus *Amphiesma*, yaitu *Amphiesma arquus* (David dan Vogel, 2009) dari Borneo (Kalimantan). Spesiasi yang terjadi di *Sundaland*

pada dasarnya sangat dipengaruhi oleh faktor geografi dimana daratannya terpisahkan oleh barier lautan, dan kemudian menyebabkan terjadinya seleksi alami dan aliran genetik (*genetic drift*) yang berpengaruh pada perbedaan komposisi genetik. Kondisi ini jelas mengacu pada kondisi spesiasi secara alopatrik (Futuyama, 2005).

1.3 Malayan Pit Viper, *Calloselasma rhodostoma* (Kuhl, 1824)

2.3.1 Status Taksonomi

Status *C. rhodostoma* (IUCN, 2018) termasuk dalam kategori *Least Concern* (resiko rendah), dikarenakan terdistribusi luas, terutama di kawasan lindung, dan hanya memiliki sedikit ancaman. Namun, tingginya tingkat penebangan hutan yang menyebabkan hilangnya habitat saat ini dapat mempengaruhi subpopulasi lokal pada jenis ular ini (Grismer dan Chan-Ard, 2012). Malayan Pit Viper (*C. rhodostoma*) merupakan jenis ular berbisa dari subfamili Crotalinae, famili Viperidae (Uetz dan Hillermann, 2018). Jenis ular ini pertama kali dideskripsikan oleh Heinrich Boie dalam buku (*Erpétologie deJava*) dimana naskah ini tidak dipublikasi secara resmi. Informasi tersebut didapatkan melalui publikasi Friedrich Boie pada tahun 1827, dimana F. Boie mengambil sitasi dari buku tersebut. Jenis ular ini dipublikasikan secara resmi oleh seorang naturalis dan zoologis dari Jerman Heinrich Kuhl, sebagai *Trigonocephalus rhodostoma*. Spesies ini kemudian mengalami beberapa kali perubahan nama (sinonim), diantaranya adalah *Trigonocephalus rhodostoma* (Boie, 1827), *Leiolepis rhodostoma* (Duméril & Bibron, 1854), *C. rhodostoma* (Cope, 1860), *Agkistrodon rhodostoma* (DeRoil, 1917); (Cochran, 1930); (Sworder, 1933), *Ancistrodon annamensis* (Angel, 1933), *Agkistrodon annamensis* (Bourret, 1936), *Ancistrodon rhodostoma* (Smith, 1943), *Calloselasma rhodostoma* (Welch, 1994).

Klasifikasi *C. rhodostoma* menurut McDiarmid dkk. (1999);

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Class	: Reptilia
Ordo	: Squamata
Family	: Viperidae
Genus	: <i>Calloselasma</i>

Spesies : *C. rhodostoma* (Kuhl, 1824).



(Uetz dan Hillerman, 2018)

Gambar 8. Ular *C. rhodostoma* (Kuhl, 1824).

2.3.2 Distribusi dan Ekologi

Malayan Pit Viper termasuk *pit viper* daerah tropis yang memiliki habitat terestrial dan terdistribusi luas di Asia Tenggara. Data persebaran ular ini diketahui mulai dari Thailand, meliputi daerah Takua Pa dan Tap-Phut, Thailand Selatan (Pauwels dkk., 2000), Lop Buri, Sakon Nakhon, Korat, Chiang Mai, Nakhon Si Thammarat, Trang dan Phuket (Taylor, 1965), Pegunungan Phnom Nam Lyr (Kamboja bagian timur) (Stuart dkk., 2006b), Pegunungan Cardamom (Baratdaya Kamboja) (Stuart dkk., 2006a). Persebaran *C. rhodostoma* di Semenanjung Malaya meliputi Alor Star (Kedah bagian utara), Bangnara (Patani) (Sworder, 1933). Sedangkan distribusi di Indonesia meliputi Jawa, Pulau Karimunjawa, dan Pulau Kangean (Das, 2010). Data museum berhasil mencatat sampel dari Sumatera (ZMA. RENA. 21576) di Museum Naturalis Leiden, Netherland, dan dari North Borneo (MZB. 428) di Museum Zoologicum Bogorienc/LIPI Bogor, Indonesia. Informasi terbaru menunjukkan bahwa ular ini juga terdistribusi di Ketapang, Pontianak, Kalimantan Barat.

Ular *C. rhodostoma* berhabitat mulai dari hutan dataran rendah yang kering, perkebunan, persawahan, kombinasi antara semak-semak dan area berbatu, sampai dengan pegunungan sampai batas ketinggian 1524 mdpl (Das, 2010). Ular ini merupakan jenis ular nokturnal atau banyak melakukan aktivitas pada malam hari (Tweedie, 1953). Beberapa spesies dari ordo rodentia dengan ukuran kecil, burung, dan amfibi adalah mangsa dari ular ini (Daltry dkk.,

1998). Reproduksi bersifat ovipar dengan jumlah telur berkisar 13-30 butir telur. Betina akan mengerami dan menjaga telurnya untuk proses inkubasi selama 30-47 hari (Das, 2010).

2.3.3 Morfologi *C. rhodostoma* Kuhl, 1824

Calloselasma rhodostoma memiliki rata-rata total panjang tubuh (ujung mulut sampai ekor) 810 mm (Boulenger, 1896). Morfologi kepala memiliki ujung moncong yang meruncing, dengan bagian ujung seperti mengarah ke atas, sisik rostral semakin kedalam semakin lebar, sepasang sisik internasal, dan sepasang sisik prefrontal. Sisik frontal memiliki ukuran yang sama panjangnya atau lebih pendek sedikit dari sisik parietal. Sisik preokular terpisah dari posterior nasal yang dipisahkan oleh sebuah sisik loreal, serta terdapat satu atau dua sisik postokular dan satu sisik subokular yang memisahkan bagian mata dari sisik labial. *Loreal pit* terpisah dari sisik labial. Ular tanah memiliki jumlah sisik supralabial (sisik bibir bagian atas) antara 7-9. Sisik *C. rhodostoma* termasuk dalam kategori sisik yang halus (*smooth*) dengan jumlah 21 sisik pada bagian sisik dorsal. Jumlah sisik ventral yaitu 138-157, dengan sisik anal *entire* (penuh), jumlah sisik subkaudal 34-54 pasang (Boulenger, 1896).

Tubuh memiliki warna kemerah-merahan, keabu-abuan, atau bagian atas tubuh coklat pucat, dengan bagian *angular* (tulang punggung) yang besar. Spot hitam secara berpasangan pada kedua sisi berlawanan secara bergantian dan sebuah garis vertebral cokelat gelap. Bibir berwarna kekuning-kuningan atau pink, dengan adanya bercak berwarna coklat tidak merata. Sisi lateral kepala cokelat gelap (diantara supralabial dan mata). Sebuah pita/garis cerah tampak di bagian atas dari mata sampai dengan bagian sudut dari mulut. Pada bagian bawahnya terdapat warna kekuning-kuningan, dengan spot bintik-bintik cokelat keabu-abuan (Boulenger, 1896).

Tabel 1. Perbandingan jumlah sisik (meristik) *C. rhodostoma* koleksi museum Leiden, Belanda (Boulenger, 1896).

No.	Jenis Kelamin	Sisik ventral	Sisik subkaudal	Lokalitas	Kolektor
1.	♂	148	51	Jawa	-
2.	♂	145	46	Jawa	A. Scott, Esq. (P).
3.	♀	143	34	Jawa	A. Scott, Esq. (P).
4.	♀	156	36	Jawa	-

5.	♂	148	50	Batavia	R. Kirkpatrick, Esq. (P).
6.	♀	154	34	Batavia	R. Kirkpatrick, Esq. (P).
7.	♀	157	37	Batavia	R. Kirkpatrick, Esq. (P).
8.	♂	149	48	Gn. Wilis, Kediri (5000 ft)	Baron v. Huegel (C.).

1.4 Morfometri

Analisis morfologi merupakan salah satu langkah analisis standar yang digunakan dalam mendeskripsikan suatu spesies baru. Karakter morfologi yang dimiliki oleh sebagian besar spesies mampu memberikan informasi identitas taksonomi dan hubungan evolusi antara masing-masing taksa (Ruane, 2015). Disisi lain, informasi morfologi memiliki keterbatasan pada beberapa spesies, sehingga tidak dapat menjelaskan hubungan filogenetik (Mayr, 1942). Meskipun memiliki keterbatasan, karakter morfologi mampu memberikan informasi tambahan terkait taksa tertentu (sifatnya terbatas), terutama perbedaan karakter yang menunjukkan variasi pada suatu taksa (Ruane, 2015). Pendekatan dengan menggunakan morfologi salah satunya adalah morfometri geometrik (GM), dimana analisis ini menggabungkan data teknik analisis bentuk (morfologi) yang menilai distribusi spasial secara relatif dari sebuah objek yang telah ditentukan (Zelditch dkk., 2012). Penggunaan teknik ini banyak dilakukan dalam mendeskripsikan variasi pada beberapa grup taksonomi, termasuk kura-kura darat (Claude dkk., 2003), kadal (Stayton, 2005; Kaliontzopoulou dkk., 2007; Leaché dkk., 2009), mamalia (Cardini dkk., 2009) dan ular (Vogel dkk., 2014). Karakter pengukuran morfometri dapat dilakukan pada semua spesies ular dengan penentuan karakter yang berbeda, contohnya adalah pada spesies *Trimeresurus popeiorum* (Viperidae) yang dilakukan oleh Vogel dkk. (2004).

Tabel 2. Daftar variabel karakter morfologi dan singkatan.

Nomor	Singkatan	Karakter
Morfometri		
1	SVL	Panjang ujung mulut sampai dengan kloaka
2	TaL	Panjang ekor
3	TL	Panjang total
4	HL	Panjang kepala
5	SnL	Panjang ujung mulut (dari ujung rostral sampai ke anterior mata)

6	HED	Diameter horizontal mata
7	VED	Diameter vertikal mata
8	DEL	Jarak sisi bawah mata sampai dengan bibir
9	DEN	Jarak antara anterior mata dan nostril
10	DEP	Jarak antara anterior mata dan <i>loreal pit</i>
11	WInN	Lebar dari sisik internasal (rata-rata)
12	LSupOc	Panjang sisik supraokular
13	WSupOc	Lebar sisik supraokular
14	L3SL	Panjang sisik ke-3 supralabial
15	H3SL	Tinggi sisik ke-3 supralabial
16	H4SL	Panjang sisik ke-4 supralabial
17	Ta/TL	Rasio jarak ekor dibagi dengan panjang total
18	SnL/HL	Rasio jarak ujung mulut dibagi dengan panjang kepala
19	DEP/HL	Rasio jarak mata ke <i>pit</i> organ dibagi dengan panjang kepala
20	DEN/HL	Rasio jarak mata ke nostril dibagi dengan panjang kepala
21	DEP/DEN	Rasio jarak mata ke pit organ dibagi dengan jarak mata ke nostril
22	WInN/WSupOc	Rasio lebar sisik internasal dibagi dengan lebar sisik supraokular
23	L3SL/HL	Rasio panjang sisik ke-3 supralabial dibagi panjang kepala
24	VED/DEL	Rasio diameter mata secara vertikal dibagi dengan jarak mata dengan sisi samping bibir
25	LSupOc/WSupOc	Rasio panjang sisik supraokular dibagi dengan lebar sisik supraokular

Meristik

26	DSR	Baris sisik dorsal
27	MSR	Baris sisik dorsal pada tengah tubuh
28	VEN	Sisik ventral
29	SC	Sisik subkaudal
30	SL	Sisik supralabial
31	HeSc	Sisik kepala (sisik pada baris longitudinal antara internasal dan batas leher)
32	SnSc	Sisik ujung mulut (moncong) (sisik pada garis antara internasal

		dan garis yang menghubungkan bagian anterior mata)
33	InN	Sisik internasal
34	Can	Sisik <i>canthal</i> (sisik antara internasal dan subocular)
35	Cep	Sisik <i>chepalic</i> (sisik pada garis antara tengah Supraokular)
36	Tem	Sisik temporal
37	IL	Sisik infralabial
38	NVEN	Jumlah dari sisik ventral
39	NSC	Jumlah dari sisik subkaudal
40	NASR	Jumlah dari baris sisik dorsal belakang kepala
41	NMSR	Jumlah dari baris sisik dorsal pada tengah tubuh
42	NPSR	Jumlah dari baris sisik dorsal sebelum kloaka
43	KMSR	Lunas dari baris sisik dorsal pada tengah tubuh
44	TNSL	Jumlah total dari sisik supralabial
45	C3SL	Jumlah sisik antara sisik ke-3 supralabial dan subokular
46	C4SL	Jumlah sisik antara sisik ke-4 supralabial dan subokular
47	C45SL	Jumlah sisik antara sisik ke-4 dan ke-5 supralabial dan subokular
48	NCep	Jumlah dari sisik <i>shepalic</i> pada garis antara sisik Supraokular
49	KOcc	<i>Lunas</i> pada sisik oksipital
50	KTem	<i>Lunas</i> pada sisik temporal
51	NInN	Jumlah sisik yang terpisah pada internasal
52	CSupOC	Jumlah sisik yang bersentuhan langsung dengan sisik supraokular
53	NSnSc	Jumlah sisik pada ujung mulut atau moncong
54	NHeSc	Jumlah dari sisik kepala secara longitudinal
55	TNIL	Jumlah total dari sisik infralabial
Pola		
56	DBB	Adanya pita gelap pada tubuh
57	VSB	Adanya garis putih pada area vertebral
58	POSTM	Adanya coreng pada postokular jantan
59	POSTF	Adanya coreng pada postokular betina
60	CPOST	Pewarnaan pada coreng postokular

61	VELSM	Adanya sebauh strip ventrolateral pada jantan
62	VELSF	Adanya sebauh strip ventrolateral pada betina
63	CVEL	Susunan warna pada coreng postokular
64	COLEM	Warna mata pada jantan
65	COLEF	Warna mata pada betina
66	TAP	Pola pada ekor

1.5 Penanda Molekuler

Perkembangan genetika molekuler meletakkan genomik sebagai dasar dalam proses menentukan status taksonomi suatu biodiversitas. Penanda molekuler ini memberikan informasi genetik secara akurat dan pemahaman yang lebih baik dalam memahami genetik pada hewan. Salah satu penanda genetik adalah gen atau urutan DNA yang selama ini diketahui berlokasi pada kromosom. Penanda genetik dapat berupa urutan DNA yang pendek, seperti sebuah urutan DNA yang memiliki perbedaan pada satu pasang basa tunggal (*Single Nucleotide Polymorphisme*, SNP) atau sebuah urutan panjang seperti mini dan mikrosatelit. Beberapa tahun terakhir banyak penelitian yang berfokus pada penanda molekuler, hal ini berkaitan dengan pengungkapan polimorfisme pada level DNA, yang mana memainkan peran penting dalam mempelajari genetika pada hewan (Al-Samarai, 2015). Salah satu penanda yang selama ini digunakan dalam dunia hewan untuk mendapatkan keturunan unggul adalah dengan menggunakan penanda fenotip (karakteristik hewan secara eksternal) atau penanda morfologi yang meliputi warna bulu, bentuk tubuh, struktur kulit, dan karakteristik anatomi (van Wezel dan Rodgers, 1996; Gizaw dkk., 2007).

Penanda fenotip bergantung pada pengamatan secara visual dan pengukuran untuk identifikasi, klasifikasi, dan ciri evolusi genetik dari spesies yang berbeda atau populasi. Penanda ini sering kali kurang akurat ketika digunakan untuk evaluasi pada tingkat genetik hewan karena lebih berdasarkan penilaian subjektif dan deskriptif. Penanda lain yang lebih akurat adalah penanda secara sitologi yang meliputi beberapa kriteria, seperti kariotipe kromosom, *bandings*, *repeats*, translokasi, delesi, dan inversi yang dapat digunakan untuk mengetahui genetik pada hewan (Yang dkk., 2013). Mutasi pada kromosom dapat dimanfaatkan untuk mengetahui adanya variasi genetik (Bitgood, 1990), dimana mutasi ini dapat digunakan sebagai penanda untuk mengidentifikasi sebuah gen pada lokasi tertentu di kromosom. Pada hewan domestik, penanda

sitologi memungkinkan untuk identifikasi keragaman genetik hewan tersebut, yaitu dengan membandingkan jumlah dan struktur kromosom antara hewan hasil domestikasi dan nenek moyangnya (Becak dkk., 1973). Sampai pada saat ini, penanda sitologi masih banyak digunakan dalam menjelaskan asal-usul dan klasifikasi spesies (Jonker dkk., 1982).

Penanda lain yang dapat digunakan adalah penanda biokimia, seperti jenis darah dan isoenzim. Penanda ini mewakili sifat biokimia yang nantinya dapat ditinjau dengan elektroforesis protein. Perbedaan komposisi dalam asam amino dan isozim dapat digunakan untuk mengidentifikasi variasi genetik dalam spesies dan hubungan kekerabatan/filogenetik diantara spesies (Buvanendran dan Finney, 1967). Pengaplikasian dari penanda ini sangat terbatas dikarenakan protein dan isozim bukan merupakan material genetik yang merupakan hasil dari ekspresi suatu gen, sehingga kedua material ini dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Drinkwater dan Hetzel, 1991). Disisi lain, penanda molekuler ini merupakan yang paling efektif untuk mengamati proses mutasi pada urutan nukleotida yang terjadi pada genom suatu spesies (Yang dkk., 2013). Penanda molekuler yang sering digunakan dalam dunia penelitian yaitu *Marker Assisted Selection (MAS)*, *Molecular and Quantitative Genetic*, *Allozyme Marker*, *Mitochondrial DNA (mtDNA)*, *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, *Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)*, *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)*, *Microsatellites*, *Single-nucleotide polymorphism (SNP)*, *DNA Barcoding Markers* (Al-Samarai, 2015).

Penanda genetik yang sering digunakan dan spesifik untuk analisis filogeografi pada hewan adalah DNA mitokondria (Avisé, 1998). DNA mitokondria dapat menjelaskan proses evolusi secara molekuler dan ekologi, selain itu DNA mitokondria sebagian besar berfungsi sebagai penanda genetik yang netral dan dapat menjelaskan beberapa situasi yang sebelumnya terjadi. DNA mitokondria merupakan genom ekstra kromosomal dalam sel mitokondria yang terletak di luar inti sel, yang mana diwariskan dari induk betina (ibu) tanpa adanya kontribusi dari induk jantan (ayah) (Avisé, 1994). DNA mitokondria memiliki tingkat evolusi yang relatif tinggi jika dibandingkan dengan genom inti (Wan dkk., 2004). Aplikasi dari penanda molekuler ini banyak digunakan untuk konstruksi pohon kekerabatan atau filogeni dan dapat menjelaskan adanya proses sejarah evolusi. Oleh karena itu, DNA mitokondria dianggap sangat ideal untuk digunakan dalam membandingkan antar spesies (DeYoung dan Honeycutt, 2005). Diluar manfaat yang spesifik dalam filogenetik, DNA mitokondria memiliki beberapa kelemahan seperti hibridisasi, intrograsi, dan kurang lengkap dalam menjelaskan keturunan. Selain itu, DNA

mitokondria juga sedikit digunakan dalam identifikasi hilangnya variasi genetik pada level individu, seperti peristiwa identitas, individual dispersal, dan sistem perkawinan (Wan dkk., 2004). Jenis gen DNA mitokondria (mtDNA) yang sering digunakan untuk analisis filogenetik antara lain 16s rRNA, 12s rRNA, CO I (Mindell dan Honeycutt, 1990), ND4, Cyt b (Wostl dkk., 2016). NADH Dehidrogenase, sub unit 4 (ND4) merupakan salah satu dari DNA mitokondria (mtDNA) yang dikode oleh untai *guanine-rich heavy* (H) dari mtDNA yang terletak pada pasangan nukleotida antara 10760 dan 12137 (Anderson dkk., 1981; Wallace dkk., 1994) yang diwariskan oleh maternal (induk betina) pada mtDNAny (Giles dkk., 1980; Case dan Wallace, 1981).

1.6 Penelitian terkait *C. rhodostoma*

Penelitian di bidang filogenetik, khususnya *C. rhodostoma* selama ini belum banyak dilakukan. Penelitian yang sudah dilakukan meliputi perilaku reproduksi (tidak dipublikasikan) (York, 1983), proses mimikri ketika memangsa (Schuett, 1984), kasus gigitan ular yang disebabkan oleh *C. rhodosotma* (Warrel, 1986), pengalaman memelihara dan berternak (Koch, 1991), evolusi biologi *Malayan Pit Viper* (tidak dipublikasi) (Daltry, 1995), variasi bisa (*venom*) (Daltry, 1996), variasi makanan yang dimangsa (*diet*) (Daltry dkk., 1998), dan perilaku ketika bersarang (mengerami telurnya) (Hill dkk., 2006). Penelitian hubungan kekerabatan *C. rhodostoma* sendiri selama ini masih belum dilakukan, sehingga dibutuhkan evaluasi terhadap status taksonomi ular tersebut secara molekuler. Beberapa penelitian terbaru pada grup *Trimeresurus* (Maholtra dkk., 2011; Vogel, 2014; Wostl dkk., 2016) menghasilkan perubahan status taksonomi dan spesies baru pada wilayah *Sundaland*. Hal ini membuktikan bahwa adanya evolusi biogeografi pada wilayah *Sundaland* yang menjadi faktor utama dari munculnya spesies baru pada kelompok *Trimeresurus*. Kondisi *C. rhodostoma* yang terdistribusi pada beberapa pulau yang dipisahkan oleh barier laut memungkinkan terjadinya proses spesiasi. Penelitian sebelumnya tentang variasi bisa ular pada *C. rhodostoma* (Daltry dkk., 1996) menunjukkan adanya variasi pada protein bisa ular yang dihasilkan pada lokalitas yang berbeda.

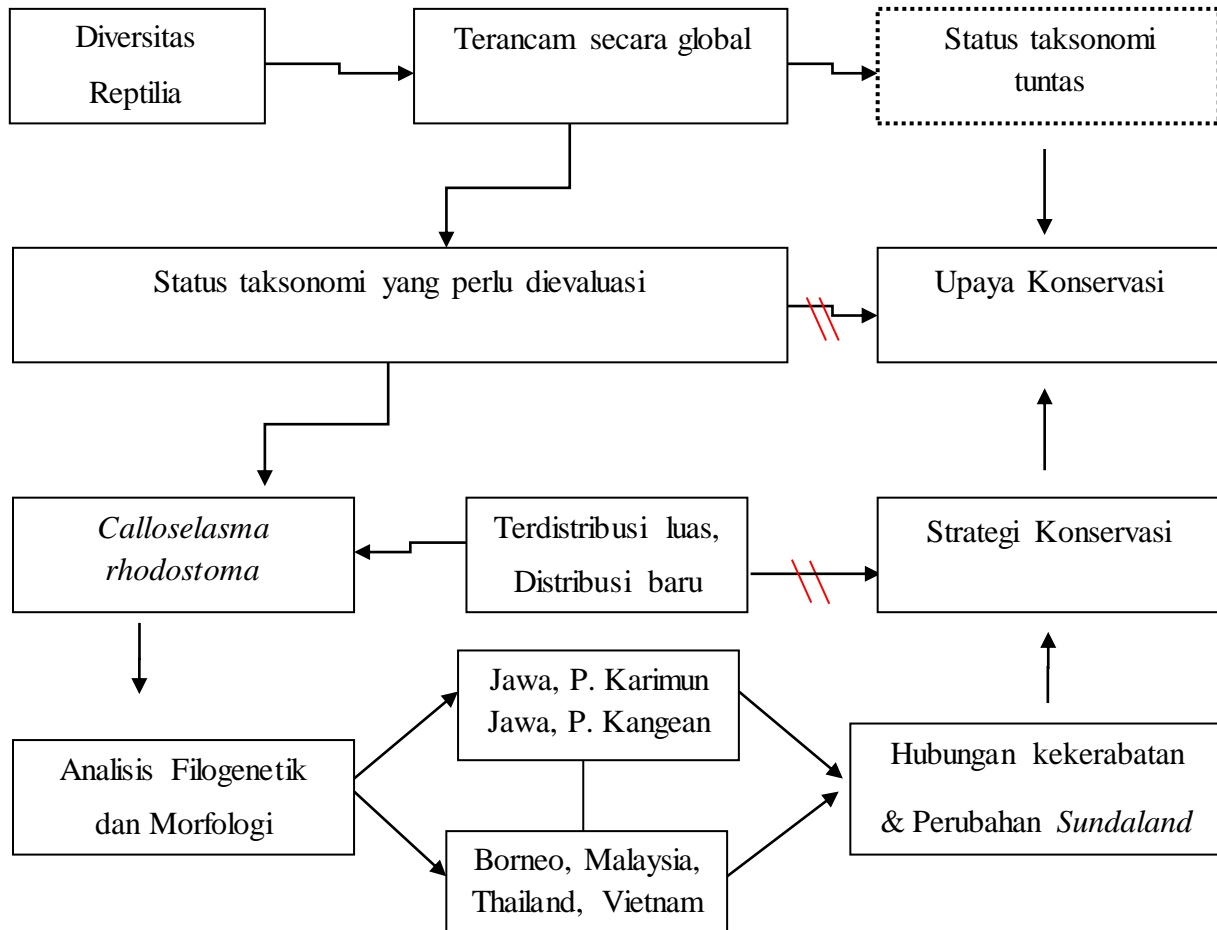
2.7 Analisis Filogenetik

Hubungan filogenetik merupakan pola umum dari pembagian atau pewarisan sejarah antara replikator biologis, seperti spesies atau gen. Pendekatan filogenetik dapat didefinisikan

sebagai proses penentuan sejarah evolusi yang diestimasi melalui analisis dari data yang dimiliki (Swofford, 1996). Pendekatan filogenetik bertujuan untuk mengemukakan suatu kumpulan hipotesis pembagian atau pewarisan sejarah melalui pohon filogenetik untuk suatu proses atau perubahan evolusioner. Selain itu, pendekatan filogenetik tidak mencoba mengungkapkan suatu kesimpulan yang umum, tetapi hanya memunculkan pernyataan terkait suatu sejarah yang khusus dan unik (Lemey dkk., 2009). Sekuen DNA yang disejajarkan dapat digunakan untuk analisis filogenetik melalui dua kriteria, yaitu jenis data yang digunakan dan strategi analisis untuk rekonstruksi pohon filogenetik. Kriteria pendekatan berdasarkan jenis data dibagi menjadi dua, yaitu *distance-matrices method* atau *distance based method* dan *discrete-characters method* atau *character based method*. Berdasarkan strategi pendekatannya juga dibagi menjadi dua, antara lain algoritmik dan *optimality criterion*. Metode-metode tersebut masing-masing memiliki keunggulan dan kekurangan, sehingga perlu adanya pemilihan jenis metode yang didasarkan pada lamanya waktu komputasi yang dibutuhkan dan hasil filogeni yang mendekati suatu hubungan kekerabatan, serta sejarah evolusi yang sebenarnya (Lemey dkk., 2009).

Metode berdasarkan karakter (*character-based method*) merupakan metode filogenetik yang analisisnya didasarkan secara langsung pada karakter penyusun sekuen, bukan berdasarkan matriks jarak sekuen. Metode ini menghitung akumulasi titik mutasi dari seluruh sekuen untuk analisisnya. Pengumpulan informasi tiap karakter tersebut dapat digunakan untuk mempelajari dinamika evolusi dari setiap karakter. Seluruh metode berdasarkan karakter menggunakan pendekatan *optimality criterion*. Metode yang termasuk dalam kategori ini ada tiga yaitu *Maksimum Parsimony*, *Maksimum Likelihood*, dan *Bayesian Inference* (Lemey dkk., 2009).

2.8 Kerangka Konsep



Populasi ular *C. rhodostoma* yang tersebar di beberapa pulau di Asia Tenggara (Jawa, Karimun Jawa, Kangean Madura, Kalimantan (data terbaru), Thailand, Semenanjung Malaya, Vietnam, Laos, Kamboja) memungkinkan terjadinya spesiasi akibat dari terputusnya aliran gen dan proses mutasi. Status LC pada spesies ini (IUCN, 2018) menunjukkan dibutuhkannya suatu tindakan atau perhatian khusus untuk menjelaskan status taksonominya yang terbaru melalui hubungan kekerabatan atau filogenetik secara molekuler. Analisis kekerabatan pada spesies ini nantinya akan memberikan informasi terbaru terkait status taksonomi ular *C. rhodostoma*, data persebaran terbaru, sehingga nantinya akan menunjang informasi terbaru dalam strategi konservasi pada spesies tersebut.

BAB III

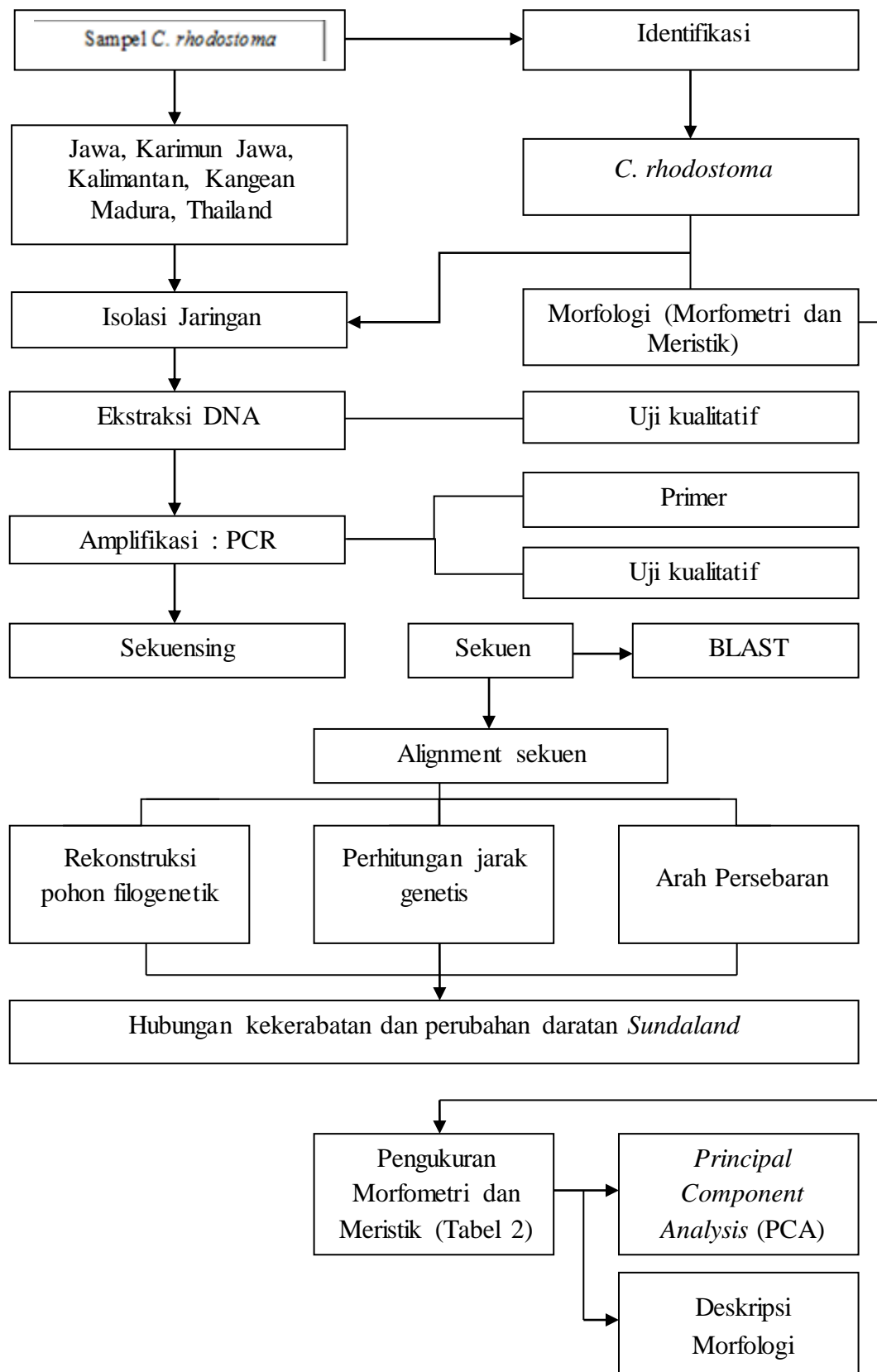
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2017–Juni 2018 di Laboratorium Ekologi dan Biodiversitas Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Sekuensing sampel DNA dilakukan melalui pelayanan *Genetika Science*, Jakarta, Indonesia.

3.2 Kerangka Operasional

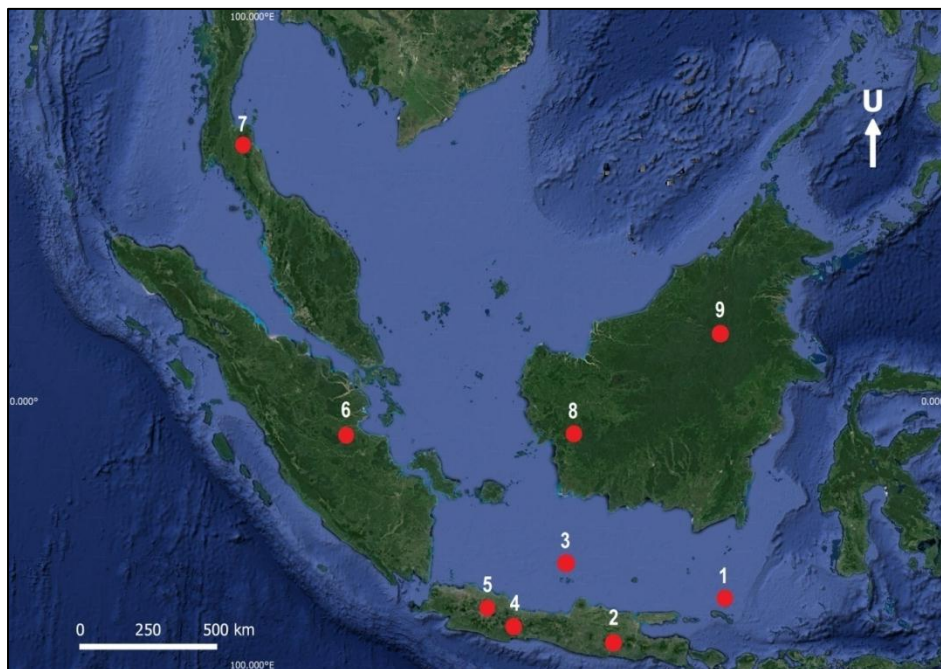
Sampel *C. rhodostoma* dikoleksi dari beberapa lokasi di Jawa, Pulau Karimun Jawa, Kalimantan, dan Thailand. Sampel tersebut diidentifikasi secara morfologi, serta diambil jaringan otot di bawah sisiknya (sisi punggung) untuk analisis molekuler. Proses identifikasi meliputi analisis morfometri dan meristik pada beberapa karakter yang sudah ditentukan (Tabel 2). DNA dari jaringan otot *C. rhodostoma* diekstraksi dan dilanjutkan dengan uji kualitatif dan kuantitatif. Hasil dengan kualitas terbaik dari tiap lokasi sampel akan dilanjutkan dengan amplifikasi DNA menggunakan primer *forward* dan *reverse* ND4 (*NADH dehydrogenase subunit 4*). Hasil amplifikasi DNA diuji kualitasnya dengan gel elektroforesis. Sekuensing dilakukan pada sampel hasil amplifikasi dengan kualitas terbaik. Hasil sekuen dari masing-masing sampel dianalisis dengan menggunakan *software* BLAST di NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) untuk mengetahui tingkat similaritas sekuen dengan database di *genbank*. Selanjutnya, hasil sekuen *alignment* menggunakan *software* MEGA6. Hasil *alignment* digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik, jarak genetik antar sekuen, estimasi waktu divergensi dan *haplotype network*. Pohon filogenetik direkonstruksi untuk memberikan informasi hubungan kekerabatan dari *C. rhodostoma*, estimasi waktu divergensi akan memberikan informasi waktu divergensi antar individu, dan *haplotype network* dapat memberikan informasi peta hubungan *haplotype* dari masing-masing sampel. Hasil analisis tersebut selanjutnya dapat digunakan untuk mengungkapkan hubungan kekerabatan dan evolusi *C. rhodostoma* di Asia Tenggara, khususnya di Indonesia, sehingga dapat digunakan untuk mengevaluasi status taksonomi dan status konservasi ular *C. rhodostoma*.



3.3. Langkah Penelitian

3.3.1 Koleksi Sampel

Pengambilan sampel hidup dilakukan pada beberapa lokasi di Jawa, Pulau Karimun Jawa, Pulau Kangean Madura, Kalimantan, dan Thailand. Proses koleksi data dilakukan pada malam hari dengan metode VES (*Visual Encounter Survey*), atau pencarian aktif secara acak pada area yang sudah diidentifikasi sebagai daerah persebarannya. Identifikasi sampel di lapang dilakukan secara morfologi dengan menggunakan buku panduan *A Field Guide to the Reptiles of South-East Asia* (Das, 2010). Titik koordinat lokasi penemuan sampel *C. rhodostoma* ditandai menggunakan GPS (*Geographic Positioning System*). Pengambilan jaringan dilakukan pada bagian otot (sisi bagian punggung). Jaringan otot sampel dari tiap individu per lokasi dikoleksi dan disimpan pada *tube* koleksi (*microtube* 1,5 ml) yang berisi alkohol absolut (96-99%). Sampel *C. rhodostoma* dipreservasi dalam alkohol 70% dan disimpan sebagai awetan basah di Laboratorium Ekologi dan Biodiversitas Hewan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Brawijaya, Malang.



Gambar 9. Peta lokasi pengambilan sampel *C. rhodostoma* di Indonesia dan sekitarnya. Keterangan: 1. Kangean; 2. Trenggalek; 3. Karimunjawa; 4. Cilacap; 5. Majalengka; 6. Sumatera; 7. Nakkon Si Tamarat (Thailand); 8. Ketapang, Kalimantan Barat; 9. Borneo Utara.

Tabel 3. Sampel ular *C. rhodostoma* yang digunakan dalam penelitian.

No	Voucher	Spesies	Negara	No. GenBank	Lokasi
1	-	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Kangean Madura, Jawa Timur
2	-	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Kangean Madura, Jawa Timur
3	NK 0597	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Sumedang, Jawa Barat
4	NK 0598	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Sumedang, Jawa Barat
5	NK 0599	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Sumedang, Jawa Barat
6	NK 0600	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Sumedang, Jawa Barat
7	NK 0269	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Gresik, Jawa Timur
8	NK 1270	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Cilacap, Jawa Tengah
9	NK 1271	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Cilacap, Jawa Tengah
10	NK 1607	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Ketapang, Kalimantan Barat
11	NK 1608	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Ketapang, Kalimantan Barat
12	NK 1609	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Ketapang, Kalimantan Barat
13	NK 1610	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Ketapang, Kalimantan Barat
14	NK 1611	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Ketapang, Kalimantan Barat
15	NK 1612	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Ketapang, Kalimantan Barat
16	NK 1613	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Ketapang, Kalimantan Barat
17	NK 1614	<i>C. rhodostoma</i>	IDN	-	Ketapang, Kalimantan Barat
18	PT 297	<i>C. rhodostoma</i>	THAI	-	Nakon Si Thammarat, Thailand Selatan
19	AM A54	<i>C. rhodostoma</i>	THAI	AY352813	Satun Province, Thailand
20	UMMZ 184314	<i>C. rhodostoma</i>	THAI	U41878	-
21	-	<i>Hypnale nepa</i>	MYS	AF517223	India

22	AM B306	<i>Ovophis chaseni</i>	MYS	AY352825	Mt. Kinabalu, Sabah, Malaysia
23	-	<i>Hypnale zara</i>	IND	DQ305477	India
24	-	<i>Hypnale hypnale</i>	IND	HHU41884	-

Keterangan: NK=Nia Kurniawan (Universitas Brawijaya, Indonesia); PT=Panupong Tammacothii (Universitas Culaongkorn, Thailand); AM=Anita Malhotra (Universitas Bangor, Inggris); UMMZ=Museum Zoologi Universitas Michigan (Amerika); CAS=Akademi Sains California (Amerika); IDN =Indonesia; THAI=Thailand; MYS=Malaysia; IND =India.

3.3.2 Pengukuran Morfometri dan Meristik

Pengambilan data morfologi dilakukan pada 42 spesimen yang dikoleksi dari Jawa (♂: 7, ♀: 15), Karimunjawa (♂: 4, ♀: 3), Kangean Madura (♂: 3, ♀: 3), dan Kalimantan Barat (♂: 4, ♀: 3). Pengukuran dilakukan dengan menggunakan jangka sorong dengan tingkat ketelitian 0.05 mm pada karakter yang telah ditentukan untuk *C. rhodostoma* (Tabel 4), meliputi karakter morfometri dan meristik yang mengacu pada Vogel dkk., (2004), dan Dowling (1951). Pengukuran pada karakter panjang ujung mulut sampai kloaka (SVL) dan panjang ekor (TaL) dilakukan menggunakan meteran dengan tingkat ketelitian 1 mm. Pengukuran dilakukan pada spesimen *C. rhodostoma* yang memiliki ukuran panjang total tubuh (TL) ≥ 400 mm.

Tabel 4. Variabel karakter morfologi dan singkatan yang digunakan dalam penelitian.

Nomor	Singkatan	Karakter
Morfometri		
1	SVL	Panjang ujung mulut sampai kloaka
2	TaL	Panjang ekor
3	TL	Panjang total
4	HL	Panjang kepala
5	HW	Lebar kepala
6	DE-Nostril	Jarak antara anterior mata dan nostril
7	SnL	Panjang ujung mulut (dari ujung rostral sampai ke anterior mata)
8	ED	Diameter mata (horisontal)
9	Ta/TL	Rasio antara panjang ekor dibagi dengan panjang total

10	SnL/HL	Rasio antara panjang ujung mulut dibagi dengan panjang kepala
11	HL/SVL	Rasio antara panjang kepala dibagi panjang ujung mulut sampai kloaka
12	SnL/ED	Rasio antara panjang ujung mulut dibagi dengan diameter mata (horisontal)
Meristik		
13	NASR	Jumlah sisik dorsal belakang kepala
14	NMSR	Jumlah sisik dorsal pada bagian tengah tubuh (<i>midbody</i>)
15	NPSR	Jumlah sisik dorsal di area sebelum kloaka
16	NVEN	Jumlah sisik ventral
17	NSC	Jumlah sisik subkaudal
18	NSL	Jumlah sisik supralabial
19	NIL	Jumlah sisik infralabial
20	NASR	Jumlah dari baris sisik dorsal belakang kepala
21	NMSR	Jumlah dari baris sisik dorsal pada tengah tubuh
22	NPSR	Jumlah dari baris sisik dorsal sebelum kloaka

Pengolahan data morfometri dilakukan dengan analisis univariat dan multivariat. Analisis univariat terdiri dari rata-rata, standar deviasi, nilai terendah dan nilai tertinggi pada setiap karakter. Sedangkan analisis multivariat meliputi *Principal Component Analysis* (PCA). Analisis diawali dengan mengelompokkan hasil pengukuran berdasarkan jenis kelamin untuk menghindari seksual dimorfisme. Karakter yang digunakan dalam analisis PCA meliputi SVL, TaL, TL, HL, DE-Nostril dan ED. Standarisasi dilakukan dengan membagi setiap karakter dengan nilai SVL dan dikonversi menjadi persentase, kemudian ditransformasi dengan log10. Nilai hasil standarisasi dianalisis dengan software PAST3. Hasil analisis PCA berupa grafik pengelompokkan sampel, nilai *factor loading*, nilai *eigen* (97.5%), dan % *variance*.

3.3.3 Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan DNA kit Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit). Prosedur ekstraksi mengikuti protokol perusahaan dengan sedikit modifikasi. Langkah

awal dimulai dengan penggerusan 25 mg sampel jaringan otot menjadi potongan yang lebih kecil dan dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml. *Buffer* ATL sebanyak 180 µl ditambahkan ke dalam mikrotube dan di-*vortex* selama 15 detik. Sebanyak 20 µl *ProteinaseK* ditambahkan ke dalam mikrotube dan di-*vortex* selama 15 detik. Setelah tercampur, sampel kemudian diinkubasi dalam *waterbath* selama 1–3 jam (jika sampel sudah terdilusi, maka dapat dilanjutkan ke tahapan selanjutnya) pada suhu 56°C, selama proses inkubasi, dilakukan *vortex* selama 2-3 kali per jam. Kemudian, sampel yang telah homogen ditambahkan 200 µl *buffer* AL dan di-*vortex*. Sampel kembali diinkubasi dalam *waterbath* selama 10 menit pada suhu 70°C, kemudian ditambahkan 200 µl etanol 96-99% dan di-*vortex*.

Seluruh larutan dalam mikrotube 1.5 ml dipindahkan ke dalam QIAamp *Mini Spin Column* dan dipasang dalam *microtube* yang baru. *Wash buffer* AW1 ditambahkan sebanyak 500 µl ke dalam *spin column* dan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dalam tabung koleksi dibuang dan *spin column* kembali dipasang pada tabung koleksi yang baru. *Wash buffer* AW2 ditambahkan sebanyak 500 µl ke dalam *spin column* dan disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 1 menit. DNA akan mengendap pada membran *spin column*, sedangkan debris akan melewati membran dan masuk ke dalam tabung koleksi. Supernatan dalam tabung koleksi dibuang, *spin column* dipindahkan ke dalam tabung koleksi (mikrotube 1.5 ml) yang baru serta ditambahkan *Elution buffer* AE 200 µl pada *spin column*. Tahapan selanjutnya adalah inkubasi pada suhu ruang (15-25°C) selama 1 menit, dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Langkah sebelumnya diulang, dan DNA akan didapatkan dari supernatan hasil sentrifugasi.

3.3.4 Analisis Kualitatif Ekstraksi DNA

Analisis kualitatif dilakukan pada hasil ekstraksi DNA dengan uji kualitatif menggunakan gel elektroforesis dengan agarose 1%. Langkah awal dimulai dengan mencampurkan TBE (*Tris Buffer EDTA*) sebanyak 35 ml dengan serbuk agarose (0.35 gr) pada gelas ukur. Selanjutnya, larutan tersebut dipanaskan pada *microwave* selama 1-3 menit (sampai larutan tercampur dengan baik). Larutan agar kemudian didiamkan sampai dingin dan ditambahkan 2 µl EtBr (*Ethidium Bromide*) dan dihomogenasi secara perlahan hingga tercampur dengan baik. Larutan kemudian dituangkan ke dalam elektroforesis set.

Elektroforesis dilakukan dengan pembuatan larutan untuk marker dan sampel. Pembuatan larutan marker dilakukan dengan cara menambahkan 1 μ l *Loading Dye* dan 2 μ l marker 1 kb ke dalam sumuran no. 1. Sedangkan pembuatan larutan sampel dilakukan dengan cara mencampurkan 1 μ l *Loading Dye* dan 2 μ l sampel pada kertas parafilm dengan menggunakan *tip* mikropipet. Elektroforesis dilakukan pada voltase 50 v selama 30 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan *Gel Doc*.

3.3.5 Amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan metode *thermocycling* PCR. Label hijau (*Go taqgreen*) digunakan sebagai penanda dalam campuran PCR. Komposisi dari campuran PCR adalah ddH₂O (3,2 μ l); *go taq green* (2x 5 μ l); primer *forward* (0,4 μ l); primer *reverse* (0,4 μ l), dan sampel DNA (1 μ l). Primer yang digunakan yaitu *forward* ND4 F:5' CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC 3', *reverse* Leu R:5' CAT TAC TTT TAC TTG GAA TTT GCA CCA 3' (Arévalo, 1994; Wostl dkk., 2016). Siklus yang digunakan yaitu denaturasi pada suhu 94°C selama 3 menit, 30 kali siklus untuk denaturasi (suhu 94°C, 30 detik), *annealing* (suhu 52°C, 45 detik), *elongation* (suhu 72°C, 1 menit), dan terakhir adalah tahapan *elongation* pada 72°C selama 7 menit. Hasil amplifikasi diuji secara kualitatif menggunakan gel elektroforesis dengan agarose 2%.

3.3.6 Sekuensing

Sekuensing dilakukan melalui layanan Genetika Science, Jakarta, Indonesia.

3.4 Analisis Data Molekuler

3.4.1 *Contig* Sekuen *Forward* dan *Reverse*

Hasil sekuensing (sekuen *forward* dan *reverse*) dilakukan (*contig*) penggabungan dengan menggunakan *software* sequencher 4.1.4 (Gene Codes, Ann Arbor, Michigan, USA) dan ChromasPro versi 1.34 (Tomohiko Shimada, Kyoto University, Japan). Hasil penggabungan dilakukan analisis kromatogram untuk mengetahui kualitas sekuen. Kemudian dilanjutkan dengan pemotongan pada sisi yang tidak bergabung. Hasil *contig* disimpan dalam format *fasta* (.fas).

3.4.2 Analisis Sekuen dari *GenBank* melalui BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

Sekuen DNA masing-masing sampel dilakukan analisis similaritas dengan database di *GenBank* menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul dkk, 1990). Program ini memiliki kemampuan untuk mendeteksi homologi suatu sekuen dan memungkinkan untuk mendeteksi suatu gen tertentu. Selain itu, BLAST juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi apakah gen atau protein yang diuji terkait dengan gen atau protein yang sudah diketahui selama ini. Pengoperasian BLAST dilakukan dengan mengunggah sekuen dalam format *fasta* pada opsi BLAST di situs www.ncbi.nlm.nih.gov. Langkah selanjutnya, tingkat homologi sekuen dianalisis berdasarkan nilai similaritas dengan sekuen yang ada di *GenBank*. Apabila persentase nilai similaritas tinggi (mendekati atau bahkan 100%) maka spesies tersebut diperkirakan merupakan satu spesies (atau berkerabat dekat) dengan spesies yang disarankan di BLAST. Sekuen dari *GenBank* yang memiliki tingkat similaritas tinggi namun berasal dari asal yang berbeda didownload sebagai data tambahan dalam analisis filogenetik.

3.4.3 Alignment Sekuen dan Analisis Jarak Genetis (*p-distance*)

Sekuen sampel dan sekuen dari *GenBank* dikompilasi menjadi satu dalam format *fasta* (.fas). Data kompilasi tersebut kemudian diinput pada software MEGA7 (Kumar dkk., 2016) Software MEGA7 berfungsi untuk eksplorasi dan analisis sekuen DNA dan protein, terutama analisis yang terkait dengan evolusi. Data tersebut kemudian di-*alignment* menggunakan opsi *Clustal W*. *Clustal W* merupakan opsi yang digunakan untuk menyelaraskan sejumlah nukleotida homolog atau sekuen protein dengan sistem *multiple alignment* dengan tujuan untuk mengetahui pola diagnostik suatu karakter protein, mendeteksi atau mendemonstrasikan homologi antara sekuen baru dengan sekuen yang sudah ada, dan sebagai langkah awal untuk analisis evolusi molekuler (Thompson dkk., 1994). Hasil *alignment* disimpan dalam format *fasta* (.fas). Nilai *uncorrected p-distance* merupakan nilai gambaran jarak genetik antar sekuen sampel yang disajikan dalam bentuk persentase. Nilai *p-distance* tersebut dihitung rata-rata, nilai tertinggi dan terendah per-spesies, serta dikelompokkan berdasarkan pulau asal masing-masing sampel.

3.4.4 Rekonstruksi Pohon Filogeni BI (*Bayesian Inference*)

Pohon filogeni direkonstruksi menggunakan model *bayesian inference*. Model evolusi yang terbaik dari sampel sekuen ditentukan menggunakan software Kakusan 4, sedangkan

Bayesian inference dianalisis menggunakan software MrBayes 3.04b (Huelsenbeck dan Ronquist, 2001). Metode ini menggunakan perhitungan *Monte Carlo Markov Chain* (MCMC) dengan 5.000.000 generasi. Perhitungan dilakukan dengan setiap kelipatan 1000 generasi dengan konsensus topologi 25%. Rekonstruksi *Bayesian inference* dianggap valid apabila nilai bootstrap 95% atau lebih (Leace dan Reader, 2002).

3.4.6 Estimasi Waktu Divergensi (*Times Divergence*)

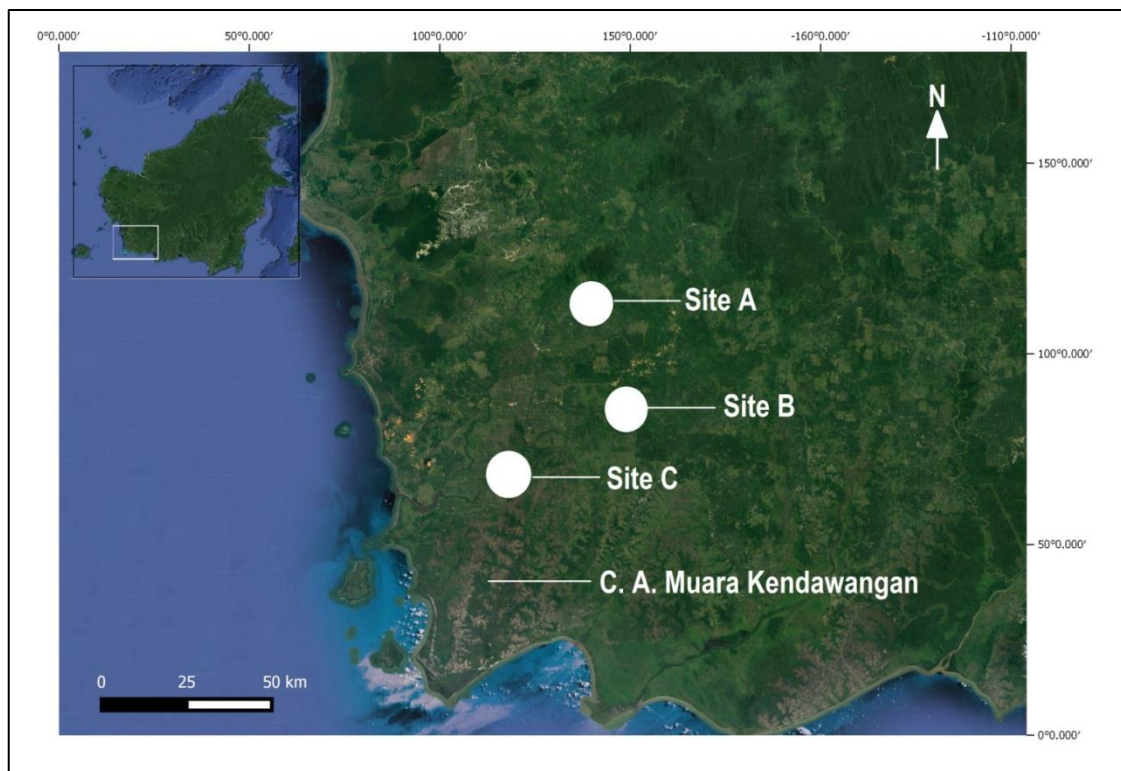
Waktu divergensi diestimasi menggunakan software BEAST (Drummond dan Rambaut, 2007), dengan model evolusi Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa dkk., 1985), dan *uncorrelated log-normal relaxed clock* (Drummond dkk., 2006). Waktu kalibrasi ditentukan menggunakan kalibrasi eksternal, yaitu berdasarkan data fosil dan literatur.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Distribusi *C. rhodostoma* di Kalimantan

Penemuan *C. rhodostoma* di wilayah Kendawangan, Kalimantan Barat, Indonesia (Gambar 11), tidak tergolong temuan baru di Pulau Kalimantan. Data koleksi yang pernah dilaporkan berupa spesimen tunggal betina dan enam anakan yang ditemukan di daerah Borneo utara pada tahun 1912 dari *Green Expedition*. Sampel tersebut disimpan di Museum Zoologicum Bogoriense (Bogor-Indonesia). Namun, data penemuan tersebut tidak pernah dipublikasikan secara ilmiah atau penemuan ini tidak pernah dilaporkan. Selain di Kalimantan, data temuan *C. rhodostoma* di Sumatera dilaporkan oleh Daltry dkk. (1998), Hill dkk. (2006), Das (2010), Uetz dan Hillermann (2018) berupa spesimen betina tunggal yang dikoleksi oleh Pluim dan tersimpan di Museum Naturalist (Leiden-Belanda) (ZMA. RENA. 21576).



Gambar 10. Peta wilayah observasi di Kalimantan Barat, Indonesia. *Insert* peta menunjukkan lokasi penemuan *C. rhodostoma* di Ketapang, Kalimantan Barat.

Keterangan C. A.= Cagar Alam.

Total *C. rhodostoma* yang berhasil dikoleksi dari 3 lokasi observasi adalah sebanyak 177 individu. Lokasi observasi I adalah Kecamatan Jelai Hulu (Desa Denaruk dan Pangkalan Suka) dan Kec. Marau (Desa Riam Batu Gading dan Runjai Jaya), dengan total 34 titik perjumpaan. Lokasi observasi II, adalah Kec. Air Upas (Desa Harapan Baru) dan Kec. Manis Mata (Desa Silat, Bukit Gajah, dan Lembah Mukti), dengan total titik perjumpaan sebanyak 53. Lokasi observasi III terdiri dari Kec. Kendawangan (Banjar Sari, Selimantan Jaya, Suka Harapan, dan Pangkalan Batu), dengan total 88 titik perjumpaan. Lokasi perjumpaan meliputi beberapa tipe habitat, termasuk perkebunan, perkampungan (*urban area*), dan hutan dataran rendah. Sebanyak 8 individu ditemukan di area perkampungan, 7 di hutan dataran rendah, dan 160 individu lainnya ditemukan di lokasi perkebunan sawit. Sebagian besar lokasi temuan *C. rhodostoma* adalah di perkampungan pada saat malam hari, dimana jenis ular ini berkamuflase dengan warna tanah. Beberapa individu bahkan ditemukan di dalam rumah (bersembunyi di balik tumpukan kayu kering). Pada perkebunan sawit, sebagian besar *C. rhodostoma* ditemukan pada tumpukan pelepah pohon sawit yang sudah kering. Hasil observasi di area perkebunan sawit menunjukkan bahwa beberapa individu betina sedang mengerami dan menjaga telurnya (total 653 telur) (dengan induk maupun tanpa induk). Individu *juvenile* ditemukan pada jarak yang berdekatan satu sama lainnya (± 0.5 m). Beberapa *Calloselasma rhodostoma* yang ditemukan tampak sedang melakukan aktifitas pada siang hari, berupa merayap di atas pohon sawit. Hasil penelitian ini mendukung data distribusi *C. rhodostoma* yang ada di Kalimantan sebelumnya.

4.1.1 Deskripsi Spesimen *C. rhodostoma* dari Kalimantan Barat

Calloselasma rhodostoma dari Kalimantan Barat memiliki dorsal berwarna merah kecoklatan dan coklat gelap dengan pola segitiga berwarna coklat gelap secara series pada setiap sisi. Das (2012) melaporkan jumlah series berkisar antara 19 sampai dengan 31 series. Pola series ini tidak begitu terlihat dengan jelas pada individu yang berwarna merah kecoklatan. Bagian dahi berwarna coklat gelap dan dibatasi garis putih pada tepi kepala, mulai dari ujung moncong sampai leher pada kedua sisi. Bagian dorso-lateral berwarna coklat gelap hingga bagian atas supralabial. Supralabial berwarna putih disertai dengan titik-titik gelap yang tersebar secara merata. Perut berwarna krem dengan bercak coklat. Ekor berwarna coklat gelap pada individu dewasa, sementara ekor *juvenile* berwarna putih kekuningan. Kepala *C. rhodostoma* berbentuk segitiga, dimana bagian leher dapat dibedakan dengan kepala. Ujung moncong kepala runcing tajam menengadah ke atas. Ekor

pipih/tipis dan pendek, serta dapat dibedakan dengan tubuh. Ukuran mata kecil dengan pupil berbentuk oval, sisik subokular bersentuhan dengan sisik supralabial ke 3 dan 4. *Calloselasma rhodostoma* memiliki organ *loreal pit* (*sensory pit*) di antara mata dan nostril. Sisik pada kloaka (*anal plate*) berbentuk *entire*, dengan sisik ekor *divided*. Jumlah sisik supralabial jantan 7, betina 7-8, infralabial jantan 10-11, betina 12, dorsal betina 22/23-21-17, betina 22/24-21-17.



Gambar 11. Spesies *C. rhodostoma* dari Kendawangan, Kalimantan Barat, Indonesia.

Tabel 5. Nilai pengukuran morfometri *C. rhodostoma* dari Kalimantan Barat (mm).

No.	Jenis Kelamin	SVL	TaL	TL	HL	HW	DE-Nostril	ED	SnL
1.	M	476	106	582	31	15.4	6.4	3.8	7.6
2.	M	451	103	554	29.1	16.6	6	3.7	7.8
3.	M	457	103	560	27.2	16.9	5.9	3.4	7.6
4.	M	403	94	494	27.5	16.7	5.6	3.2	7.8
5.	F	630	87	717	43.7	23	8.2	4	11.2
6.	F	673	92	765	42.7	26.3	8.2	4.4	10.4
7	F	663	77	740	46.1	23	8.4	5.2	11.9

Keterangan: M=Jantan; F=Betina; SVL=Panjang ujung mulut sampai kloaka; TaL=Panjang ekor; TL=Panjang total; HL=Panjang Kepala; HW=Lebar kepala; DE-Nostril=Jarak antara interior mata dan nostril; ED=Diameter mata (horisontal); SnL=Panjang ujung mulut.

Tabel 6. Perbandingan jumlah sisik (meristik) *C. rhodostoma* dari Kalimantan Barat

No.	Jenis Kelamin	Sisik Ventral	Sisik Subkaudal	Sisik Supralabial	Sisik Infralabial	Sisik Dorsal
1	M	142	48	7	10-11	23-21-17
2	M	143	47	7	10-11	22-21-17
3	M	145	48	7	11	23-21-17
4	M	142	48	7	10-11	23-21-17
5	F	151	37	8	12	24-22-17
6	F	150	37	8	12	22-21-17
7	F	149	36	7-8	12	22-21-17

Keterangan: M=Jantan; F=Betina.

Analisis meristik pada tujuh spesimen menunjukkan adanya perbedaan jumlah sisik antara individu jantan dan betina, dimana jumlah sisik pada jantan memiliki rentang jumlah yang lebih sedikit dibandingkan betina. Pada karakter sisik ventral, rentang sisik pada individu betina (149-151) lebih banyak dibandingkan individu jantan (142-145). Perbedaan tersebut juga berlaku pada karakter lain, seperti jumlah supralabial, infralabial, dan sisik dorsal. Perbedaan lain terletak pada jumlah sisik subkaudal (sisik pada ekor), dimana jumlah sisik subkaudal pada jantan lebih banyak dibandingkan betina, hal ini dipengaruhi oleh keberadaan hemipenis yang terletak di dalam ekor individu jantan.

4.1.2 Ekologi, Mangsa (*Prey*), dan Makanan (*Diet*) *C. rhodostoma* di Kalimantan Barat

Calloselasma rhodostoma tergolong ular terestrial, dimana sebagian besar hidupnya dihabiskan di atas permukaan tanah. Beberapa tipe habitat yang ditemukan selama observasi meliputi, semak-semak rumput, perkebunan sawit (tumpukan pelepah sawit, pokok batang tanaman sawit) dan perkampungan. Semak-semak rumput terdiri dari beberapa jenis tanaman, meliputi tumbuhan paku (*Neprolephis* sp.), tumbuhan rumput (*Cyperus rotundus*), tumbuhan dari famili Lygosominae, dan tumbuhan pandan (*Pandanus* sp., Pandanaceae). Tumbuhan tersebut hidup pada habitat tanah berpasir (spodosol), gambut, dan tanah mineral. *Calloselasma rhodostoma* hidup di habitat dengan rata-rata suhu lingkungan 28°C, kelembaban tanah 60%, dan pH tanah berkisar antara 4-5.5.

Calloselasma rhodostoma ditemukan melimpah di perkebunan sawit. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh daya dukung lingkungan yang tinggi, berupa habitat yang

mendukung untuk berlindung (pelepah daun yang belum membusuk sebagai tempat perlindungan) (Lynch, 2015), tersedia hewan-hewan kecil sebagai mangsa, seperti mamalia kecil, tupai, kadal, tokek, dan burung (Akani dkk., 2007). Beberapa hewan kecil yang berpotensi sebagai mangsa *C. rhodostoma* dan ditemukan di perkebunan sawit adalah tikus (tidak diketahui jenisnya) dan amfibi (*Limnonectes leporinus*, *Hylarana erythraea*, *Amnirana nicobariensis*, *Pulchrana baramica*, *Occidozyga lima*, dan *Fejervarya cancrivora*). Kemungkinan lain adalah rendahnya jumlah predator (burung hantu, elang) *C. rhodostoma*, sehingga tidak ada faktor penekan perkembangbiakan ular tersebut.

Tabel 7. Presentase kontribusi mangsa *C. rhodostoma* di Jawa, Thailand Utara dan Thailand Barat (%).

Lokasi	SVL	Mamalia dan Burung	Reptil	Amfibi	Artropoda
Jawa	< 400 mm n = 32	6.25	28.13	62.50	3.13
	> 400 mm n = 34	73.53	23.53	2.94	0.00
Thailand Utara dan Barat	< 400 mm n = 10	70.00	30.00	0.00	0.00
	> 400 mm n = 15	26.67	66.67	6.67	0.00

Pembedahan pada perut 7 individu *C. rhodostoma* berhasil mendapatkan 2 mangsa dengan jenis berbeda, yaitu tikus dan katak (jenis tidak teridentifikasi). *Calloselasma rhodostoma* merupakan jenis ular dengan tipikal menelan satu mangsa yang berukuran relatif besar, sebagai contoh, individu jantan (SVL: 60 mm) mampu menelan tikus dewasa dengan berat 75 g (30% masa tubuh ular) (Daltry dkk., 1998). Jenis mangsa dari *C. rhodostoma* yang pernah dilaporkan yaitu dari kelas Pisces, kelas Amphibia (Ranidae: *Rana* spp.), kelas Reptilia (Agamidae: *Calotes versicolor*; Scincidae: *Mabuya multifasciata*, *M. rugifera*, *Tropidophorus* sp.; Gekkonidae: *Hemidactylus* sp.; Colubridae: *Aplopeltura boa*, *Enhydryn jagori*, *Liopeltis baliodeira*, *Lycodon aulicus*), kelas Aves, kelas Mamalia (Famili Muridae: *Mus musculus*, *M. shorridgei*, *Niviventer cremoriventer*, *Rattus rattus*, *R. surrifer*) (Daltry dkk., 1998). Presentase kontribusi mangsa (Tabel 7.) dari *C. rhodostoma* menunjukkan perbedaan antar lokasi berdasarkan hasil penelitian Daltry dkk. (1998).

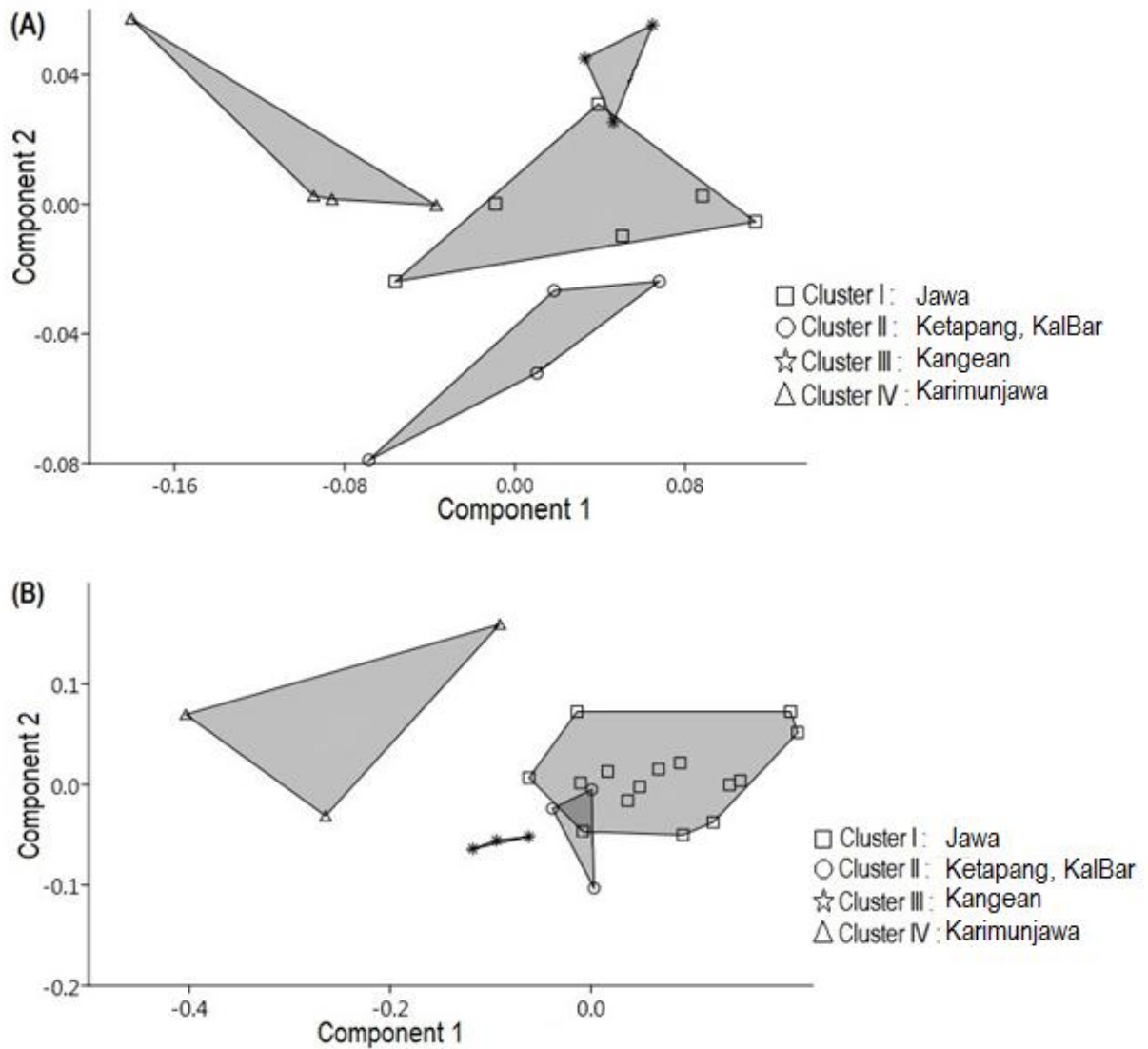
Musim kawin pada ular umumnya diinisiasi pada awal musim hujan, lebih tepatnya setelah periode *aestivation* pada musim kemarau (Gloyd dan Conant, 1990). Periode aktivitas reproduksi *C. rhodostoma* sangat bervariasi, tergantung pada masing-masing

individu (Daltry, 1995; Hill dkk., 2006). Musim kawin *C. rhodostoma* di penangkaran yang terletak di Thailand Utara dan Tengah terjadi pada bulan April, dimana *ovipositio* terjadi pada bulan Juni-Juli, dan masa bertelur pada bulan Agustus (Chanhome dkk., 2001). Observasi lapang di Malaysia Barat yang dilakukan oleh Daltry (1995) menunjukkan bahwa waktu perkawinan terjadi antara bulan Februari-Maret, proses *ovipositio* terjadi pada bulan Juni-Juli (Daltry, 1995). Sementara itu, data observasi di Jawa Barat menyatakan bahwa periode perkawinan terjadi pada bulan Oktober-November (Daltry, 1995), periode *ovipositio* bulan Februari-Maret (Bergman, 1961), dan proses bertelur pada bulan Juni (Kopstein, 1938).

Koleksi sampel *C. rhodostoma* pada penelitian ini berhasil menemukan 23 telur pada bulan Desember, 18 telur pada bulan Maret, dan 612 telur pada bulan April, sehingga total jumlah telur adalah 653 telur. *Calloselasma rhodostoma* tergolong ovipar dengan jumlah telur dalam satu periode bertelur berkisar antara 13-30 telur (Das, 2012), 14-40 (Hill dkk., 2006), 31 telur di Thailand Selatan (Bulian, 2003). Diameter telur berkisar antara 20-30 mm (Das, 2012). Hal yang menarik adalah *C. rhodostoma* menunjukkan perilaku mengerami telur atau *parental care*, dimana perilaku tersebut sangat minim terjadi pada jenis reptil (Shine, 1998; Hill dkk., 2006), lebih tepatnya hanya sebesar 2% (58 jenis) dari 33 genus (Hill dkk., 2006). Perilaku *parental care* tersebut berfungsi untuk melindungi telur dan sarangnya dari ancaman predator.

4.2 Perbandingan Karakter Morfologi *C. rhodostoma* di Indonesia

Principal Component Analysis (PCA) linier berfungsi untuk mengevaluasi homogenitas asal mula unit operational taksonomi (OTU). PCA menggunakan nilai kuantitatif hasil pengukuran karakter morfologi sebagai objek perhitungan (Wuster dan Thorpe, 1992; Turan, 1999; Wuster dkk., 2001; Vogel dkk., 2007). Grafik analisis PCA pada 17 spesimen jantan dan 24 spesimen betina ditampilkan pada gambar 12. Nilai dua komponen pertama *factor loadings* dari *principal component* (PC) jantan (Tabel 8), menunjukkan nilai variabilitas total moderat.



Gambar 12. Grafik *Principal Component Analysis* dari komponen 1 (PC1) dan komponen 2 (PC2) pada empat populasi *C. rhodostoma*.

Keterangan: (A) Jantan; (B) Betina.

Principal Component (PC) pertama menunjukkan nilai positif pada seluruh variabel dengan karakter TaL dan DE-Nostril memiliki nilai tertinggi, berkebalikan dengan nilai ED yang menunjukkan nilai terendah dari semua variabel yang digunakan. Pada hasil PC kedua, sebagian besar variabel menunjukkan nilai yang positif, kecuali karakter DE-Nostril. Semua karakter pengukuran tubuh menunjukkan nilai positif dengan nilai tertinggi pada karakter TaL. Hasil PCA pada jantan (Gambar 12.a.), menunjukkan pengelompokan menjadi 4 kelompok, meliputi Cluster II, Cluster III, Cluster I, dan Cluster IV. Berdasarkan pengelompokan lokalitas, Cluster I dan Cluster III terpisah, namun hasil menunjukkan

adanya sedikit tumpang tindih pada kedua cluster tersebut. Cluster II dan Cluster IV terpisah secara independen diantara empat cluster tersebut.

Tabel 8. Perbandingan jumlah nilai *factor loading* jantan dan betina pada dua komponen pertama (PC 1 dan PC2), hasil dari korelasi enam karakter *C. rhodostoma*.

Karakter	Jantan		Betina	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
SVL	0.3385	0.11874	0.43662	0.28215
TaL	0.59974	0.15619	0.35154	0.58568
TL	0.37434	0.17917	0.42449	0.33146
HL	0.28386	0.124	0.49429	-0.47495
DE-Nostril	0.54323	-0.57482	0.42554	-0.28595
ED	0.099642	0.76394	0.28318	-0.40021
Nilai <i>Eigen</i> (97.5%)	82.20	67.736	86.805	77.962
% variasi	66.31	14.54	74.117	12.383

Nilai dua komponen pertama *factor loadings* dari PC betina (Tabel 8), menunjukkan variabilitas total yang moderat, dimana nilai yang ditunjukkan hampir sama meskipun sedikit lebih tinggi. Seluruh variabel pada PC pertama menunjukkan nilai yang positif, dengan nilai tertinggi pada HL dan SVL, sementara nilai TaL menunjukkan nilai yang rendah. Nilai PC yang kedua sangat terstruktur oleh variabel yang terkait dengan karakter kepala (*chepalic*) dimana HL, DE-Nostril, dan ED menunjukkan nilai negatif. Sebaliknya, variabel yang terkait dengan karakter tubuh menunjukkan nilai yang positif dengan karakter TaL memiliki nilai tertinggi diikuti dengan karakter TL dan SVL secara berurutan. Pada grafik (Gambar 12.b), plot dari dua PC pertama menunjukkan empat kelompok: Cluster II, Cluster I, Cluster IV, dan Cluster III. Cluster II dan Cluster III dipisahkan secara independen di antara empat cluster. Cluster I dan IV berdekatan tetapi ada sedikit tumpang tindih diantara kelompok ini.

Analisis statistik *univariate* (Tabel 10.) yang terdiri dari *mean*, standar deviasi, nilai minimum dan maksimum dilakukan untuk menguji perbandingan semua karakter pada semua spesimen dari Pulau Jawa, Pulau Karimunjawa, Pulau Kangean, dan Ketapang, Kalimantan Barat. Ukuran rata-rata terbesar dan terkecil pada spesimen jantan ditemukan pada karakter TL, dengan nilai masing-masing 579,33 dari Pulau Kangean mm dan 498,75 mm dari Pulau Karimunjawa, sedangkan spesimen betina menunjukkan bahwa ukuran

rata-rata terbesar dan terkecil adalah 841,07 mm dari Pulau Jawa dan 740.67 mm dari Kalimantan Barat. Beberapa karakter menunjukkan seksual dimorfisme pada *C. rhodostoma*. Seksual dimorfisme merupakan kondisi dimana ukuran betina lebih besar dibandingkan ukuran jantan. Pada beberapa famili ular, kondisi seksual dimorfisme mengacu pada beberapa karakter, seperti SVL, ukuran relatif kepala, bentuk kepala, ukuran relatif ekor, dan masa tubuh (Shine, 1993; Krause dkk., 2003).

Indikasi seksual dimorfisme pada spesies *C. rhodostoma* diketahui dari karakter SVL, HL, HW, DE-Nostril length, SnL, rasio TaL/TL, rasio SnL/ED, jumlah sisik ventral, dan jumlah sisik subkaudal. Nilai TL (jantan x: 498.75-579.33, betina x: 550.67- 841.07) menunjukkan bahwa ukuran betina lebih panjang daripada jantan (Rivas dkk., 2001; Shine dkk., 1999). Nilai rasio TaL/TL (jantan: 0.18-0.20, betina: 0.11-0.12) juga menunjukkan seksual dimorfisme.

Salah satu manfaat dari seksual dimorfisme adalah kemampuan adaptasi pada spesies yang tumbuh dengan sedikit atau tidak adanya *parental care*. Betina yang lebih besar umumnya menghasilkan keturunan yang lebih banyak dan lebih besar. Keturunan yang lebih besar memiliki tingkat kelangsungan hidup yang lebih tinggi dan dapat menyimpan lebih banyak cadangan kuning telur untuk perkembangan selanjutnya. Sementara itu, jantan dengan ukuran yang lebih kecil memiliki dampak positif berupa kemampuan untuk menemukan dan menarik betina. Di sisi lain, individu jantan dengan ukuran yang lebih kecil memiliki indera *chemosensory* yang baik, mobilitas tinggi, tidak mencolok untuk predator, serta pematangan awal (Ford dan Seigel, 1989; Duvall dkk., 1993; Madsen dkk., 1993; Shine, 1993). Perbedaan panjang ekor antara jantan dan betina dipengaruhi oleh organ kopulasi (hemipenis) di dalam ekor. Ukuran panjang ekor akan mempengaruhi keberhasilan dalam proses perkawinan (Shine dkk., 1999).

Analisis meristik yang terdiri dari jumlah ventral, subkaudal, supralabial, infralabial, dan dorsal dapat ditinjau pada tabel 9. Kisaran jumlah karakter skala ventral pada jantan dari populasi Pulau Karimunjawa menunjukkan rentang yang lebih tinggi daripada populasi Pulau Jawa dan Kangean. Hasil tersebut berbeda dengan betina yang menunjukkan bahwa jumlah skala ventral pada populasi dari Karimunjawa dan Pulau Kangean berada dalam rentang skala ventral populasi Jawa. Sementara itu, kisaran jumlah skala subkaudal pada populasi Pulau Kangean lebih tinggi dari Jawa dan Pulau Karimunjawa, baik pada spesimen jantan maupun betina. Kisaran jumlah sisik dorsal pada spesimen betina menunjukkan bahwa populasi Jawa memiliki rentang jumlah tertinggi dibandingkan populasi lainnya.

Tabel 9. Perbandingan jumlah sisik ventral, subkaudal, supralabial, infralabial, dan dorsal *C. rhodostoma* diantara empat populasi di Indonesia.

Populasi	Sisik ventral		Sisik subcaudal		Sisik supralabial		Sisik infralabial		Sisik dorsal	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Jawa ♂ : 8, ♀: 18	144-149	148-156	48-54	31-42	7-8	7-9	10-12	11-13	22-21-17	(22-24)- 21-17
Karimunjawa ♂ : 5, ♀: 3	148-152	150-155	48-52	36-39	7-8	7-8	11-12	12-13	22-21-17	23-21- 17
Kangean ♂ : 3, ♀: 3	141-147	149-152	53-56	38-43	7-8	7-8	11	11-12	22-21-17	(22-23)- 21-17
Kalimantan Barat ♂ : 4, ♀: 4	142-145	149-151	47-48	36-38	7	7-8	10-11	11-12	(22/23)- 21-17	(22-24)- 21-17

Tabel 10. Data morfometri *C. rhodostoma* dari empat populasi. Data meliputi rata-rata dan standart deviasi, diikuti *parentheses*.

Semua pengukuran ditunjukkan dalam satuan millimeter (mm).

Karakter	Jawa		Karimunjawa		Kangean		Kalimantan Barat	
Morfologi	♂ n : 7	♀ n : 15	♂ n : 4	♀ n : 3	♂ n : 3	♀ n : 3	♂ n : 4	♀ n : 3
SVL	446.57±23.39 (399-467)	743.87±77.69 (613-892)	409.75±30.25 (382-452)	481.67±32.08 (451-515)	465.67±9.07 (459-476)	614.67±15.18 (601-631)	446.75±31.05 (403-476)	655.33±22.50 (630-673)
TaL	109.29±7.83 (96-119)	97.20±10.10 (82-116)	89.00±7.39 (82-98)	68.33±6.66 (61-74)	113.67±4.51 (109-118)	76.00±7.81 (71-85)	101.50±5.20 (94-106)	85.33±7.64 (77-92)
TL	555.71±30.20 (495-568)	841.07±85.07 (704-1008)	498.75±34.88 (474-550)	550.67±35.56 (514-585)	579.33±12.74 (571-594)	690.67±10.79 (683-703)	548.25±36.22 (497-582)	740.67±24.01 (717-765)
HL	28.90±1.41 (27-30.7)	45.00±3.53 (39.1-52)	26.55±1.47 (25.4-28.7)	28.53±4.24 (23.7-31.6)	29.80±1.06 (28.6-30.6)	40.10±1.22 (39.3-41.5)	28.70±1.75 (27.2-31)	44.17±1.75 (42.7-46.1)
HW	16.59±1.23 (14.7-18.2)	30.36±4.27 (23.3-36.1)	17.08±0.88 (16.1-18)	20.83±3.97 (16.5-24.3)	16.43±0.75 (15.7-17.2)	26.57±1.32 (25.4-28)	16.40±0.68 (15.4-16.9)	24.1±1.91 (23-26.3)
DE- Nostril	5.89±0.65 (5.1-7.1)	8.62±0.60 (7.6-9.9)	5.05±0.72 (4-5.6)	5.93±1.07 (4.7-6.6)	5.60±0.20 (5.4-5.8)	7.43±0.15 (7.3-7.6)	5.60±0.20 (5.6-6.4)	8.27±0.12 (8.2-8.4)
SnL	7.24±0.83 (6.4-8.7)	10.77±0.91 (9.4-12.7)	6.40±0.50 (5.8-6.9)	6.83±1.53 (5.1-8)	8.50±0.20 (8.3-8.7)	10.27±0.40 (9.9-10.7)	7.70±0.12 (7.6-7.8)	11.17±0.75 (10.4-11.9)
ED	3.99±0.21 (3.8-4.3)	4.73±0.64 (3.1-5.8)	3.98±0.22 (3.7-4.2)	3.77±0.06 (3.7-3.8)	4.13±0.06 (4.1-4.2)	4.53±0.15 (4.4-4.7)	3.53±0.28 (3.2-3.8)	4.53±0.61 (4-5.2)
TaL/TL	0.20±0.01	0.12±0.01	0.18±0.01	0.16±0.04	0.20±0.00	0.11±0.01	0.19±0.00	0.12±0.01

	(0.19-0.20)	(0.09-0.13)	(0.17-0.19)	(0.12-0.18)	(0.19-0.20)	(0.10-0.12)	(0.18-0.19)	(0.10-0.12)
SnL/HL	0.25±0.02	0.24±0.01	0.24±0.02	0.24±0.02	0.29±0.01	0.26±0.02	0.27±0.02	0.25±0.01
	(0.23-0.30)	(0.22-0.26)	(0.22-0.26)	(0.22-0.26)	(0.27-0.30)	(0.24-0.27)	(0.25-0.28)	(0.24-0.26)
HL/SVL	0.06±0.00	0.06±0.0	0.07±0.01	0.06±0.01	0.06±0.0	0.07±0.0	0.06±0.00	0.07±0.01
	(0.06-0.07)	(0.05-0.07)	(0.06-0.07)	(0.05-0.07)	(0.06-0.07)	(0.06-0.07)	(0.06-0.07)	(0.06-0.07)
SnL/ED	1.81±0.15	2.32±0.42	1.61±0.11	1.82±0.43	2.06±0.03	2.27±0.14	2.20±0.19	2.48±0.28
	(1.56-2.02)	(1.91-3.55)	(1.48-1.72)	(1.34-2.16)	(2.02-2.07)	(2.11-2.38)	(2.00-2.44)	(2.29-2.80)

Keterangan: SVL=Panjang ujung mulut sampai kloaka; TaL=Panjang ekor; TL=Panjang total; HL=Panjang Kepala; HW=Lebar kepala; DE-Nostril=Jarak anatara interior mata dan nostril; ED=Diameter mata (horisontal); SnL=Panjang ujung mulut.

4.2.1 Variasi Sisik Kepala

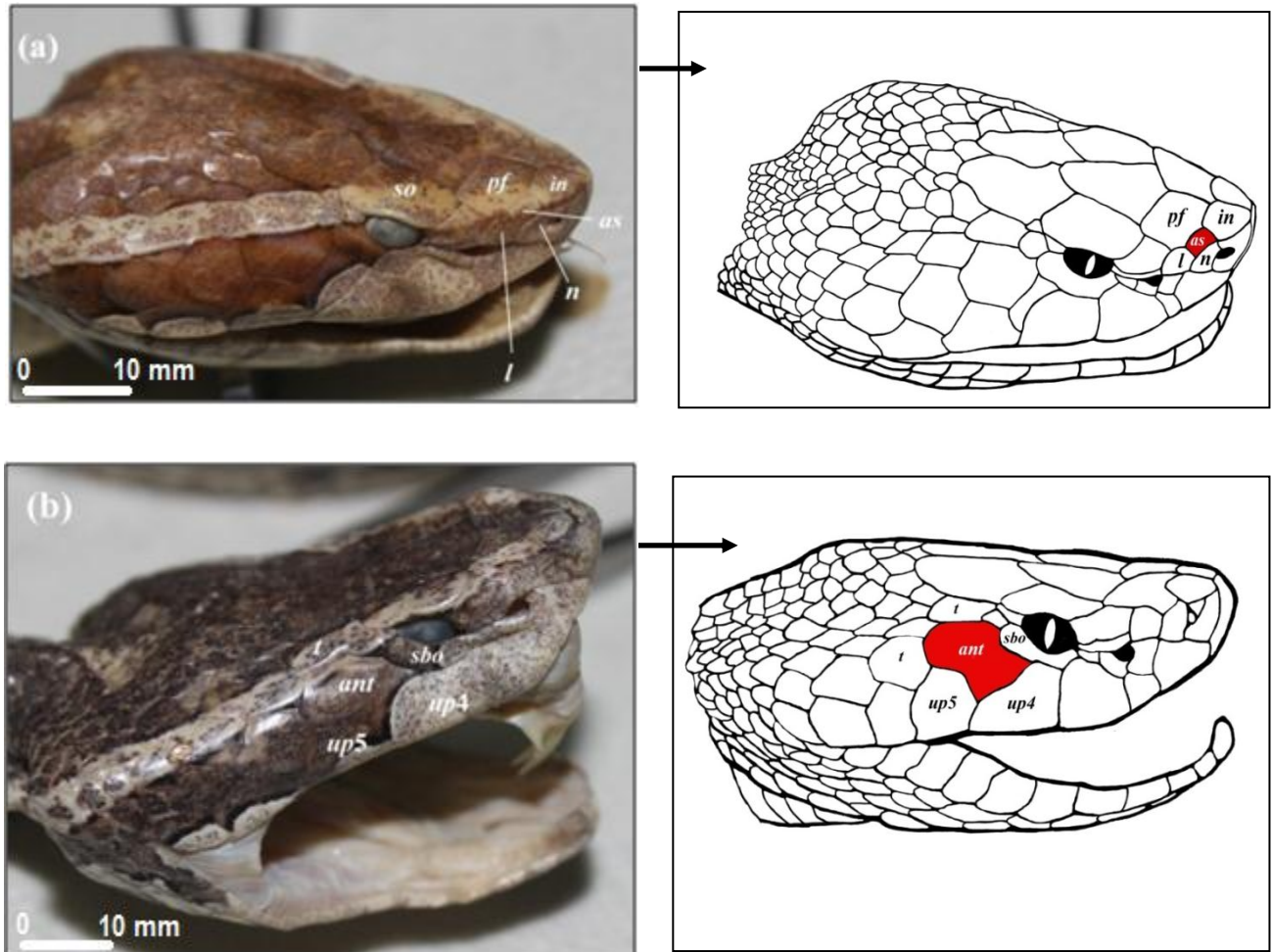
Identifikasi pada sisik kepala pada dasarnya adalah karakter pembantu dalam mengidentifikasi suatu spesies ular (Hamidy, 2006). Observasi pada sampel spesies *C. rhodostoma* dari beberapa lokasi di Indonesia (Jawa, Karimunjawa, dan Kangean), Malaysia, dan Thailand (Kadafi, *Unpublished data*), menunjukkan adanya sisik aksesoris kecil yang terletak terpisah antara sisik internasal, prefrontal, nostril dan sisik loreal pada bagian sisi kepala (Gambar 13). Sisik ini ditemukan pada beberapa individu, namun uniknya ada beberapa individu yang hanya memiliki sisik aksesoris tersebut pada salah satu bagian sisi kepala. Pengelompokan dilakukan melalui karakter ada dan tidaknya sisik aksesoris kecil pada bagian sisi kepala pada semua sampel yang digunakan. Hasil penelitian berhasil mencatat 3 tipe karakter sisik aksesoris kecil pada spesies *C. rhodostoma*, diantaranya:

- **Tipe 1** : Sisik aksesoris tidak terdapat pada kedua kepala.
- **Tipe 2** : Sisik aksesoris terdapat pada kedua sisi kepala
- **Tipe 3** : Sisik aksesoris hanya terdapat pada salah satu sisi kepala bagian kanan sedangkan pada bagian kiri tidak ada.

Karakter lain yang dapat dijadikan acuan dalam pengelompokan adalah karakter pada sisik anterior temporal. Sisik tersebut menunjukkan adanya perbedaan antar individu *C. rhodostoma*. Perbedaan tersebut ditunjukkan melalui adanya pemisahan antara sisik anterior temporal dengan sisik temporal, sedangkan variasi lain adalah tidak terdapat pemisahan atau bergabung menjadi satu kesatuan antara sisik anterior temporal dengan sisik temporal pada beberapa individu. Pada karakter tersebut, tercatat 4 tipe yang membedakan individu *C. rhodostoma*:

- **Tipe 1** : Sisik anterior temporal terdapat pada kedua sisi kepala
- **Tipe 2** : Tidak ada sisik anterior temporal pada kedua sisi kepala
- **Tipe 3** : Sisik anterior temporal terdapat pada sisi kepala bagian kiri, sedangkan pada sisi kepala bagian kanan sisik anterior temporal bergabung menjadi satu sisik dengan sisik temporal
- **Tipe 4** : Sisik anterior temporal terdapat pada sisi kepala bagian kanan, sedangkan pada sisi kepala bagian kiri sisik anterior temporal bergabung menjadi satu sisik dengan sisik temporal

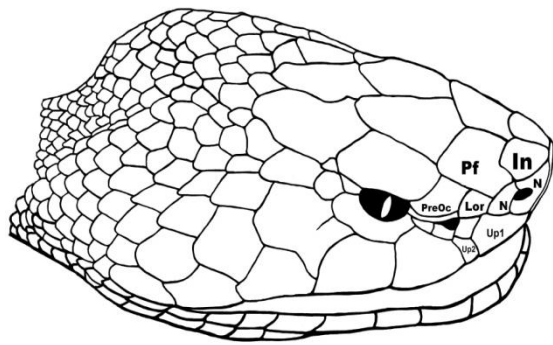
Berdasarkan pada pengelompokan tersebut, dilakukan perbandingan pada sampel *C. rodostoma* yang berasal dari Kendawangan, Kalimantan Barat, untuk mengetahui pengelompokan karakter morfologi sampel dari Kalimantan Barat.



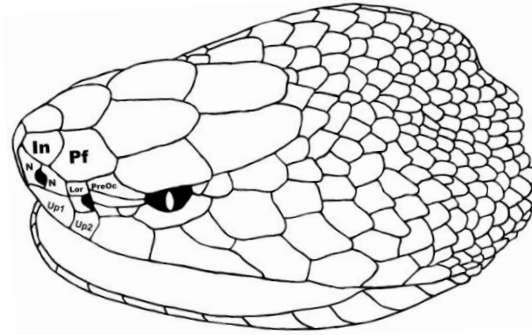
Gambar 13. Variasi sisik aksesoris kecil pada sisik kepala *C. rhodostoma* (a); dan variasi penggabungan pada sisik anterior temporal dan temporal (b).

Keterangan: *in*=internasal; *pf*=prefrontal; *so*=supraokular; *n*=nostril; *l*=loreal; *as*=sisik aksesoris; *sbo*=subokular; *up4*=upperlabial ke-4; *up5*=upperlabial ke-5; *ant*=anterior temporal.

Tabel 11. Tiga tipe variasi sisik aksesoris kecil *C. rhodostoma* di Indonesia dan sekitarnya.

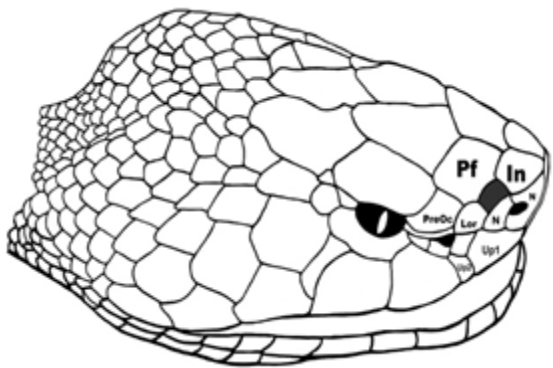


A.

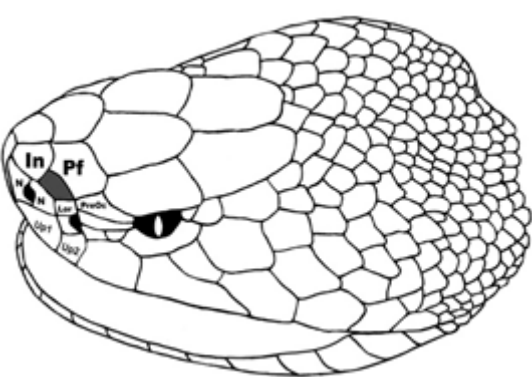


B.

Tipe 1. Sisik kepala menunjukkan tidak adanya sisik aksesoris kecil pada sisi kanan (A); dan pada sisi kiri (B). (In=Internasal; Pf=Prefrontal; Up1=Upperlabial ke-1; N=nostril; Lor=Loreal; PreOc: Preokular)

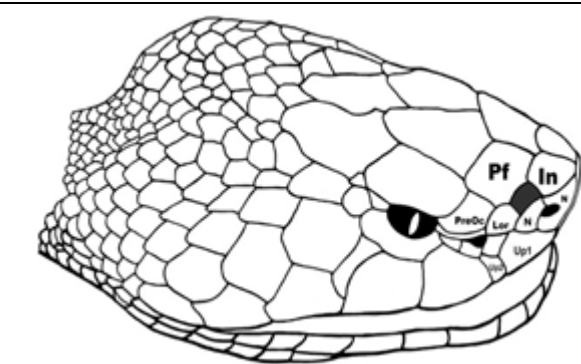


C.

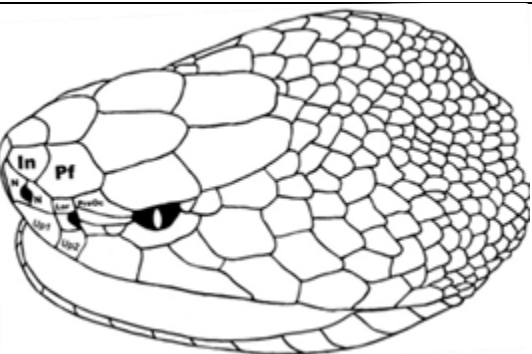


D.

Tipe 2. Sisik kepala menunjukkan adanya sisik aksesoris kecil pada sisi kanan (C); dan pada sisi kiri (D). (In=Internasal; Pf=Prefrontal; Up1=Upperlabial ke-1; N=nostril; Lor=Loreal; PreOc: Preokular)



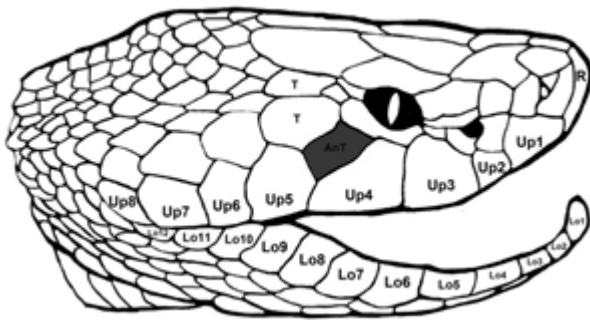
E.



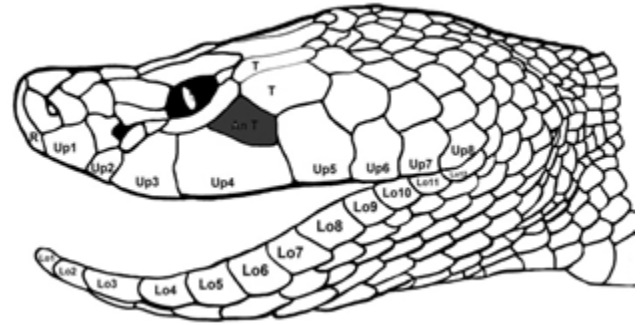
F.

Tipe 3. Sisik kepala menunjukkan adanya sisik aksesoris kecil pada sisi kepala bagian kanan (A); dan sisi kepala bagian kiri (B). (In=Internasal; Pf=Prefrontal; Up1=Upperlabial ke-1; N=nostril; Lor=Loreal; PreOc: Preokular).

Tabel 12. Empat tipe variasi sisik aksesoris kecil *C. rhodostoma* di Indonesia dan sekitarnya

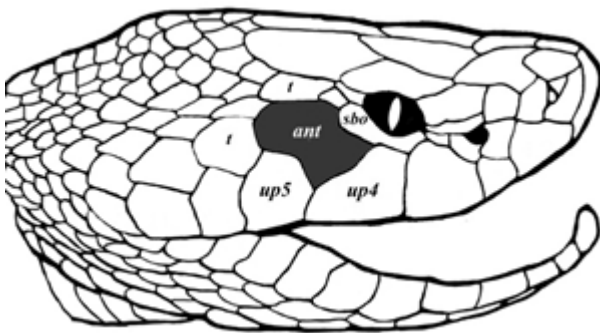


A.

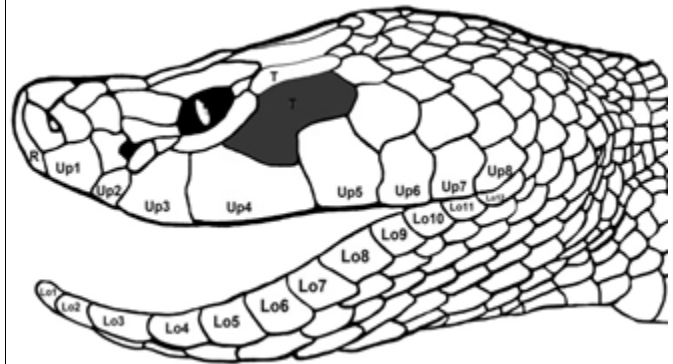


B.

Tipe 1. Sisik kepala yang menunjukkan adanya sisik anterior temporal pada sisi kanan (A); dan sisi kiri (B). Keterangan: Up1-7=Upperlabial 1-7; T=Temporal; Lo1-12=Lowerlabial 1-12.

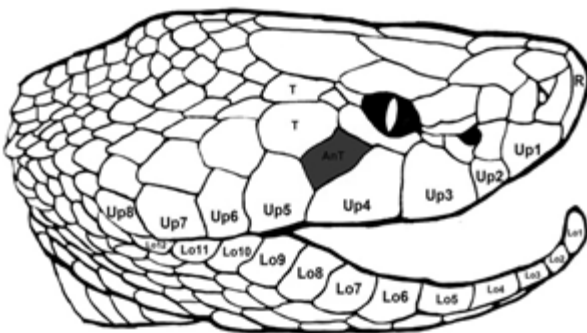


C.

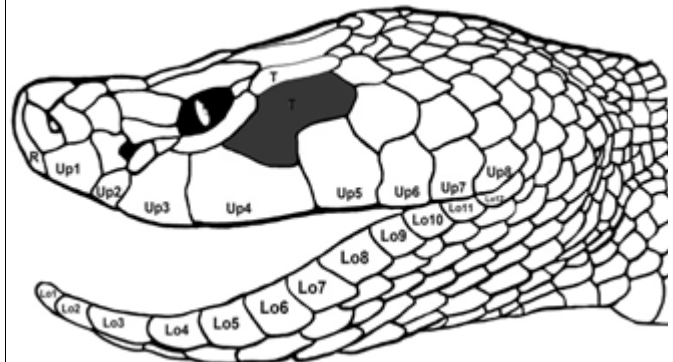


D.

Tipe 2. Sisik kepala menunjukkan adanya sisik aksesoris kecil pada sisi kanan kepala (C); dan sisi kiri (D). Keterangan: Up1-7=Upperlabial 1-7; T=Temporal; Lo1-12=Lowerlabial 1-12.

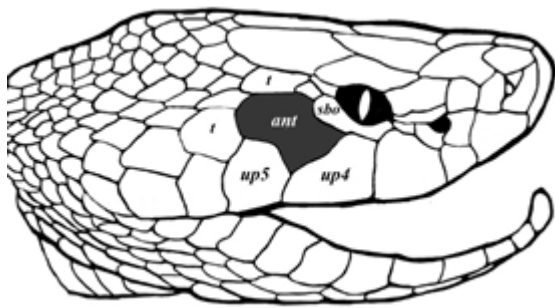


E.

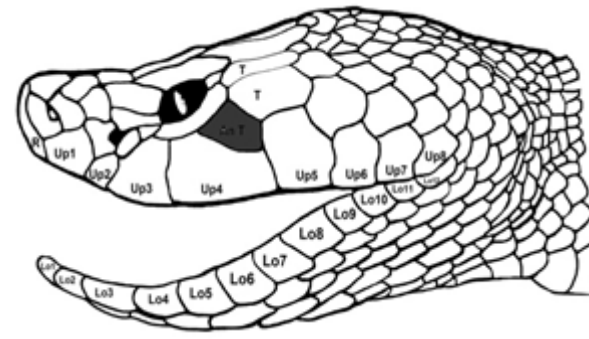


F.

Tipe 3. Sisik kepala menunjukkan adanya sisik aksesoris kecil pada salah satu sisi kepala bagian kanan (A); dan sisi kiri, (B). Sisi Kiri. Keterangan: Up1-7=Upperlabial 1-7; T=Temporal; Lo1-12=Lowerlabial 1-12.

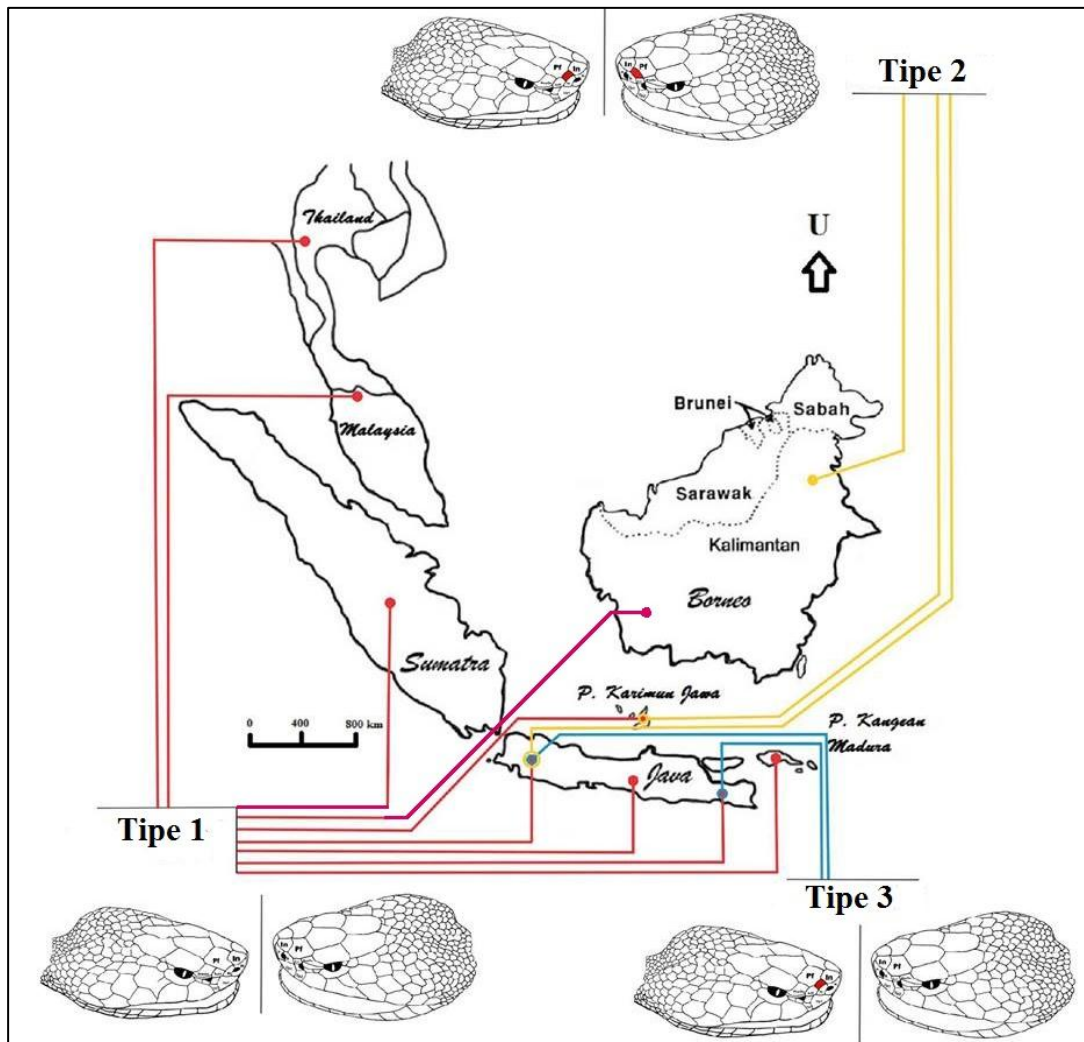


G.

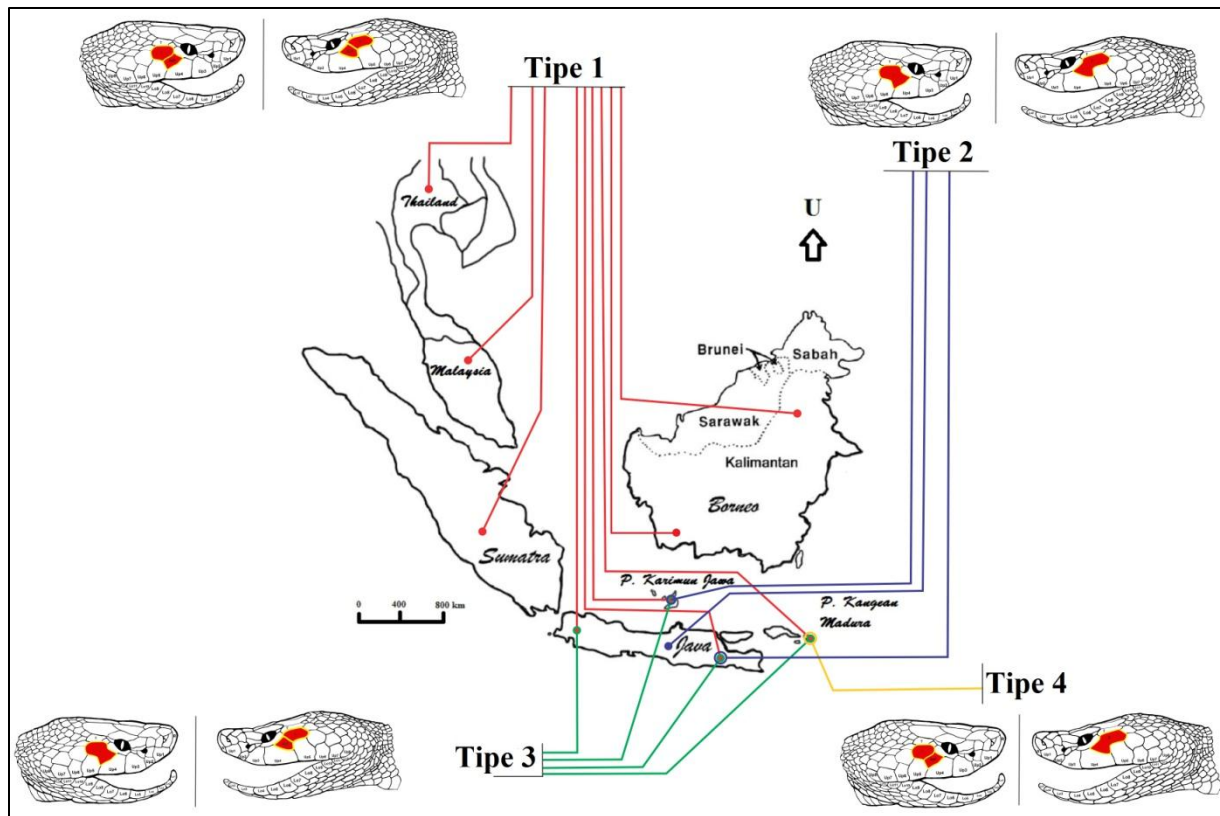


H.

Tipe 4. Sisik kepala yang menunjukkan adanya sisik anterior temporal terpisah dengan sisik temporal pada sisi kepala bagian kanan kepala (A); dan sisi kiri (B). Keterangan: Up1-7=Upperlabial 1-7; T=Temporal; Lo1-12=Lowerlabial 1-12.



Gambar 14. Tiga tipe variasi sisik aksesoris kecil *C. rhodostoma* dan persebarannya.



Gambar 15. Empat tipe variasi sisik anterior temporal *C. rhodostoma* dan persebarannya.

Analisis pada variasi sisik aksesori kecil pada sisik kepala menunjukkan bahwa spesimen Kalimantan Barat tergolong tipe 1 (tidak ada sisik aksesori kecil pada kedua sisi kepala). Tipe 1 tersebar merata pada semua lokalitas *C. rhodostoma* dan dijadikan bahan pengujian di Jawa, Karimunjawa, Kangean, Sumatera, Malaysia, dan Thailand. Keunikan lainnya terletak pada perbedaan karakter sisik anterior temporal, spesimen Kalimantan Barat tergolong sebagai tipe 1 (sisik anterior temporal jelas terpisah dengan sisik temporal pada kedua sisi kepala). Tipe 1 ini tersebar pada semua lokalitas *C. rhodostoma* yang tersebar di Indonesia, meliputi Jawa, Karimunjawa, Kangean, dan Sumatera.

Tipe 1, pada kedua variasi diduga sebagai tipe kosmopolitan pada *C. rhodostoma*, atau tipe yang tersebar meluas atau terdapat di semua lokalitas persebaran *C. rhodostoma*, termasuk Thailand, Malaysia, Jawa, Karimunjawa, Kangean, Kalimantan Barat dan Utara. Tercatat 39 spesimen memiliki variasi sisik aksesori kecil dan 34 spesimen memiliki variasi sisik anterior temporal. Tipe 1 juga diperkirakan mengacu pada topografi karakter morfologi holotype yang pernah dideskripsikan sebelumnya (RMNH.1510). Tipe 2 dan 3 pada variasi sisik aksesori ini

kemungkinan *atypical* (tidak normal), dimana hanya tercatat sejumlah 5 individu pada kedua tipe ini. Kedua tipe ini tersebar hanya pada wilayah Jawa, Karimun Jawa, dan satu spesimen dari Kalimantan Barat.

Pada tipe variasi sisik anterior temporal tipe 2 tercatat 9 spesimen, tipe 3 sebanyak 9 spesimen, dan tipe 4 hanya 1 spesimen. Ketiga tipe tersebut diduga adalah *atypical* pada spesies *C. rhodostoma* karena persebaran wilayahnya yang hanya meliputi beberapa lokalitas saja, seperti Jawa, Karimunjawa, dan Kangean. Variasi pada *C. rhodostoma* lebih banyak ditemukan di Jawa jika dibandingkan dengan pulau sekitarnya. Hal ini mengacu pada semua jenis tipe pada variasi sisik aksesoris kecil dan anterior temporal yang dapat ditemukan di Pulau Jawa. Adanya kedua jenis variasi ini juga dapat dijadikan sebagai karakter dalam identifikasi jenis *C. rhodostoma* dengan spesies lain. Variasi yang terdapat pada *C. rhodostoma* ini juga terjadi pada spesies *Naja naja* (Hamidy, 2006) yang memiliki sisik aksesoris kepala berbatasan dengan sisik prefrontal, preokular, nasal dan internasal.

4.3 Nilai (*p-distance*) *C. rhodostoma*

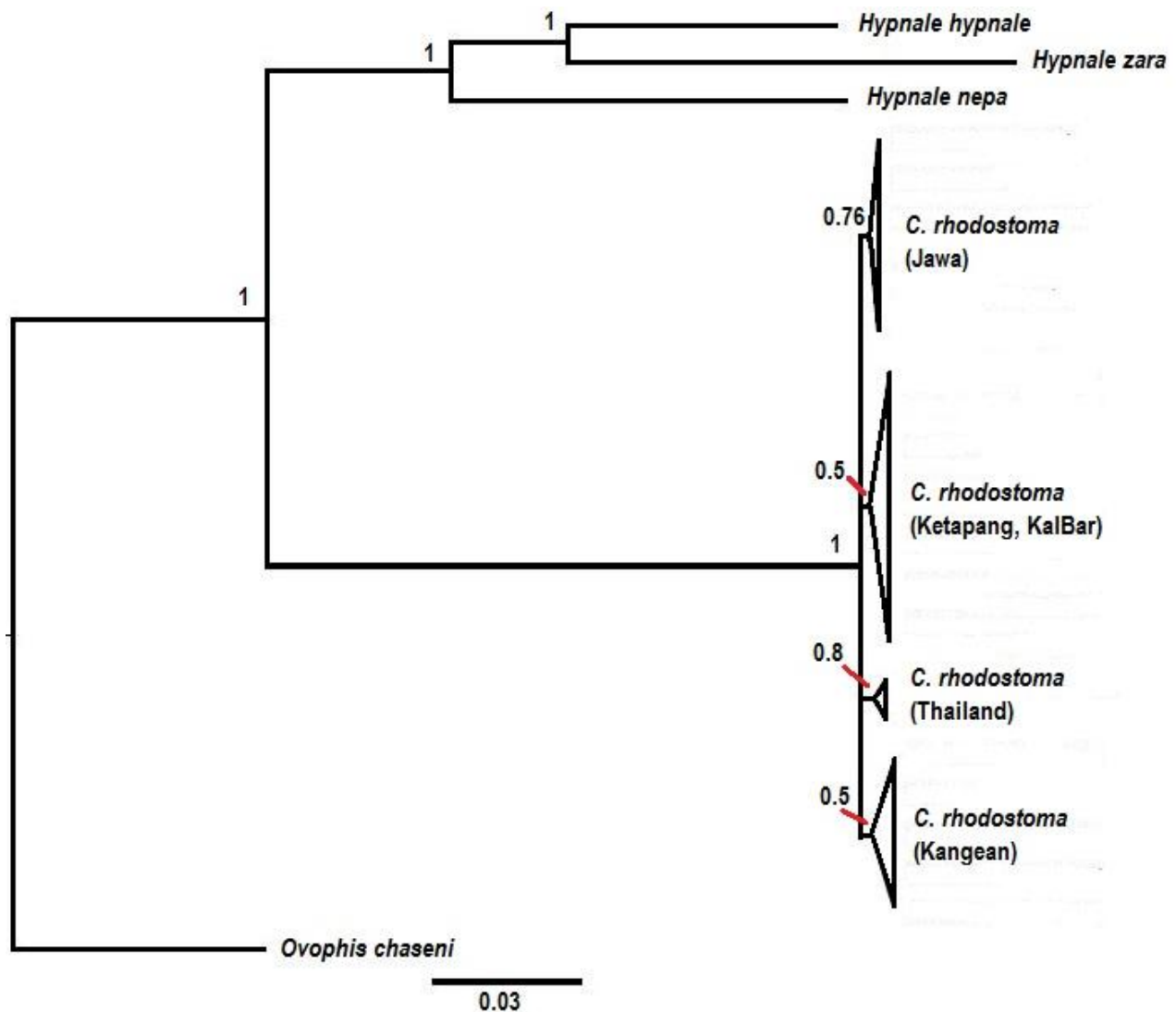
Nilai *p-distance* merupakan nilai yang menunjukkan keragaman DNA pada spesies tertentu yang dapat dijadikan sebagai perbandingan, dimana nilai tersebut diperoleh dari perbedaan pada beberapa urutan DNA. Hasil nilai *p-distance* tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara masing-masing populasi pulau. Nilai *p-distance* tertinggi ditunjukkan oleh populasi *C. rhodostoma* Madura dengan populasi Jawa dan Kalimantan yaitu masing-masing sebesar 0.39% dengan nilai minimum-maksimum (0.3-0.6) (Tabel 13). Sedangkan untuk nilai *p-distance* terendah ditunjukkan oleh populasi *C. rhodostoma* Kalimantan dengan populasi Thailand, yaitu sebesar 0.27% dengan nilai minimum-maksimum (0.2-0.5). Hasil *p-distance* antar masing-masing populasi tergolong rendah, sehingga dapat dikatakan bahwa sampel *C. rhodostoma* yang diujikan masih tergolong satu spesies meskipun terpisah oleh barrier lautan. Hal yang mendukung kesimpulan tersebut adalah genetik pada sampel yang diujikan hanya sedikit mengalami mutasi atau karakter urutan sekuen tersebut *conserve*.

Tabel 13. Nilai *p-distance* (%) intraspesies populasi *C. rhodostoma* (range: minimum-maksimum)

Populasi Pulau	Madura	Jawa	Kalimantan
Madura			
Jawa	0.39 (0.3-0.6)		
Kalimantan	0.39 (0.3-0.6)	0.35 (0.3-0.6)	
Thailand	0.28 (0.2-0.5)	0.28 (0.2-0.5)	0.27 (0.2-0.5)

4.4 Pohon Filogenetik *C. rhodostoma*

Pohon filogenetik pada dasarnya merupakan salah satu gambaran dari sejarah terjadinya proses spesiasi suatu spesies. Adanya proses spesiasi yang bersamaan dapat menciptakan dua keturunan yang akan menimbulkan percabangan politomi pada pohon filogenetik (Sayyari dan Mirarab, 2018). Analisis hubungan kekerabatan melalui konstruksi pohon filogenetik pada spesies *C. rhodostoma* belum pernah dilakukan, khususnya spesimen yang berasal dari Indonesia. Konstruksi pohon filogenetik BI (*Bayesian Inference*) membentuk topologi pohon politomi pada *C. rhodostoma* (Gambar 16) yang didukung dengan rendahnya nilai jarak genetik pada masing-masing populasi (Tabel 13). Konstruksi pohon filogenetik membentuk topologi yang tersusun dari 4 kelompok, dimana pengelompokan ini mengacu pada lokalitas sampel *C. rhodostoma*, artinya sampel yang berasal dari asal yang sama akan membentuk kelompok sendiri. Kelompok I merupakan *C. rhodostoma* dari Pulau Jawa dengan nilai *bootstrap Bayesian posterior probability* BPP=0.76. Kelompok II terdiri atas *C. rhodostoma* dari populasi Ketapang, Kalimantan Barat dengan nilai *bootstrap* BPP=0.5. Kelompok III terdiri atas *C. rhodostoma* dari Thailand dengan nilai *bootstrap* BPP=0.8. Kelompok IV merupakan *C. rhodostoma* yang berasal dari Kangean dengan nilai *bootstrap* BPP= 0.5.



Gambar 16. Pohon filogenetik *Bayesian Inference* (BI) ular *C. rhodostoma* menggunakan gen ND4.

Keterangan: Angka pada masing-masing percabangan menunjukkan nilai *bootstrap Bayesian posterior probability* (BPP).

Pohon filogenetik politomi tersebut menunjukkan sedikit perbedaan pada sekuen DNA yang diujikan (Wostl dkk., 2016). Rendahnya nilai *p-distance* mendukung bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian ini masih merupakan satu spesies yang sama, yaitu *C. rhodostoma*. Berdasarkan hasil tersebut, diperkirakan adanya kemungkinan spesiasi alopatrik pada spesies ini, mengacu pada pemisahan *Sundaland* yang terjadi sejak Paleosen (60 juta tahun yang lalu). Kondisi yang sama juga terjadi pada evaluasi spesies *pit viper* dari Sumatera, *Trimeresurus* (*Popeia*) *toba* yang dilakukan oleh Wostl dkk., (2016). *Trimeresurus* (*Popeia*) *toba* berbeda

sedikit secara morfologi dengan *T. (P.) barrati*, namun melalui pendekatan genetik (*p-distance*), kedua spesies ini tidak menunjukkan nilai perbedaan yang tinggi, sehingga disimpulkan masih berada dalam satu spesies.

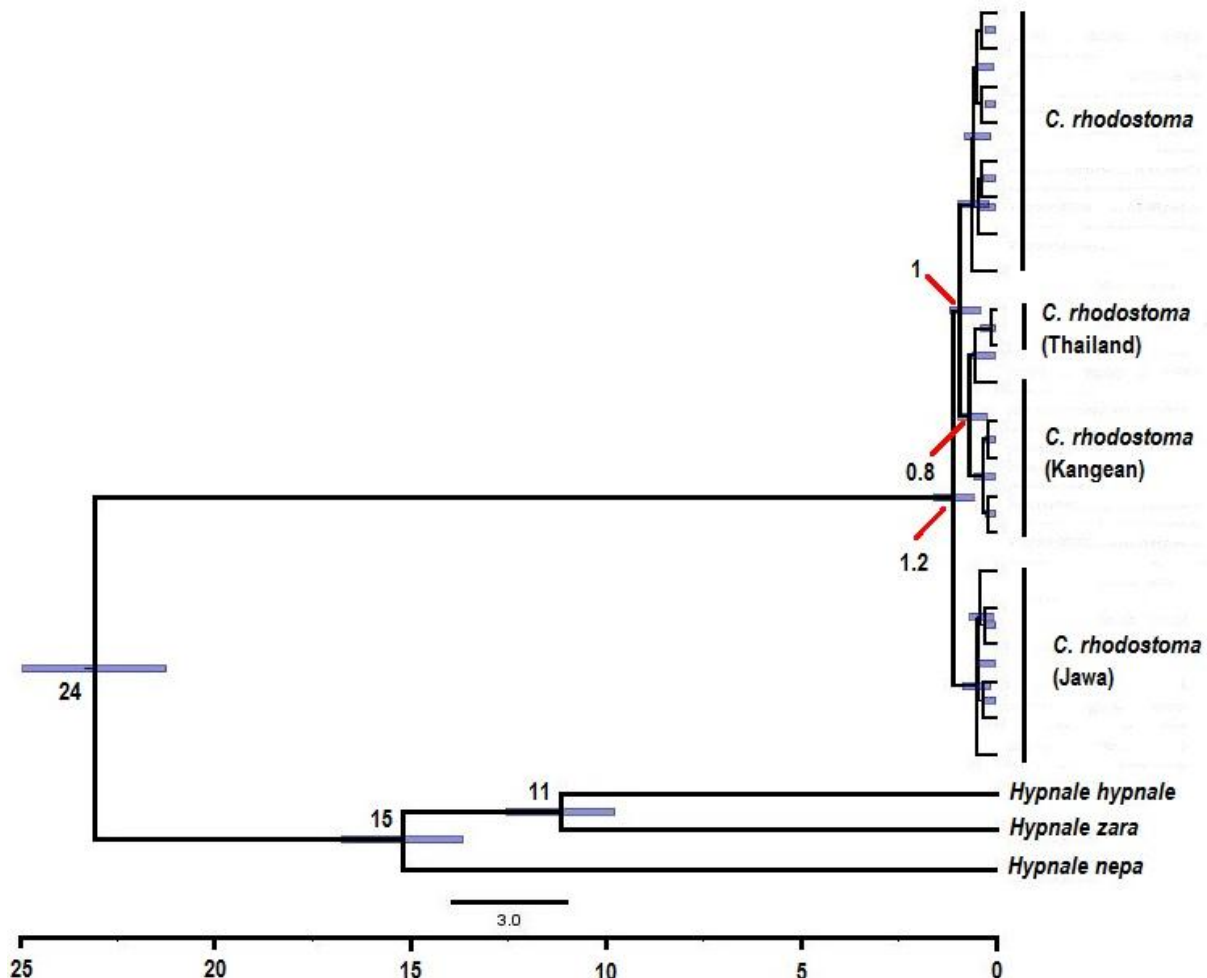
4.5 Estimasi Waktu Divergensi *C. rhodostoma*

Hipotesis perubahan molekuler menyatakan bahwa urutan DNA dan protein berevolusi pada tingkat yang relatif rendah dari waktu ke waktu di antara organisme yang berbeda. Konsekuensi yang terjadi adalah munculnya perbedaan genetik antara dua spesies sejak spesies tersebut berbagi nenek moyang yang sama, sehingga dengan menggunakan analisis waktu divergensi dapat menjelaskan estimasi rentang waktu evolusioner. Beberapa aspek yang perlu diperhatikan dalam menganalisis estimasi waktu divergensi ini adalah adanya waktu pembandingan dengan spesies lain untuk menjelaskan waktu pemisahan spesies terkait. Selain itu, estimasi waktu pemisahan ini juga mampu menjelaskan pola persebaran spesies mengikuti pola perubahan daratan di masa lampau.

Hasil estimasi waktu divergensi (Gambar 17), menjelaskan bahwa *C. rhodostoma* terpisah dengan spesies *outgroup* (*Hypnale hypnale*) sekitar 24 juta tahun yang lalu atau sekitar pertengahan Miosen (Lohman dkk., 2011). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya (Alencar dkk., 2016; Wuster dkk., 2008). Pemisahan intra-spesies *C. rhodostoma* dimulai dari populasi Jawa yang terpisah dengan populasi Kalimantan sekitar 1.2 juta tahun yang lalu. Pemisahan selanjutnya antara populasi Kalimantan dengan populasi Kangean dan Thailand yang terjadi sekitar 1 juta tahun yang lalu. Selanjutnya, pemisahan ditunjukkan antara populasi Kangean dengan populasi Thailand yang terjadi sekitar 0.8 juta tahun yang lalu. Rekonstruksi arah persebaran species *C. rhodostoma* dari populasi Thailand disajikan dalam gambar 18.

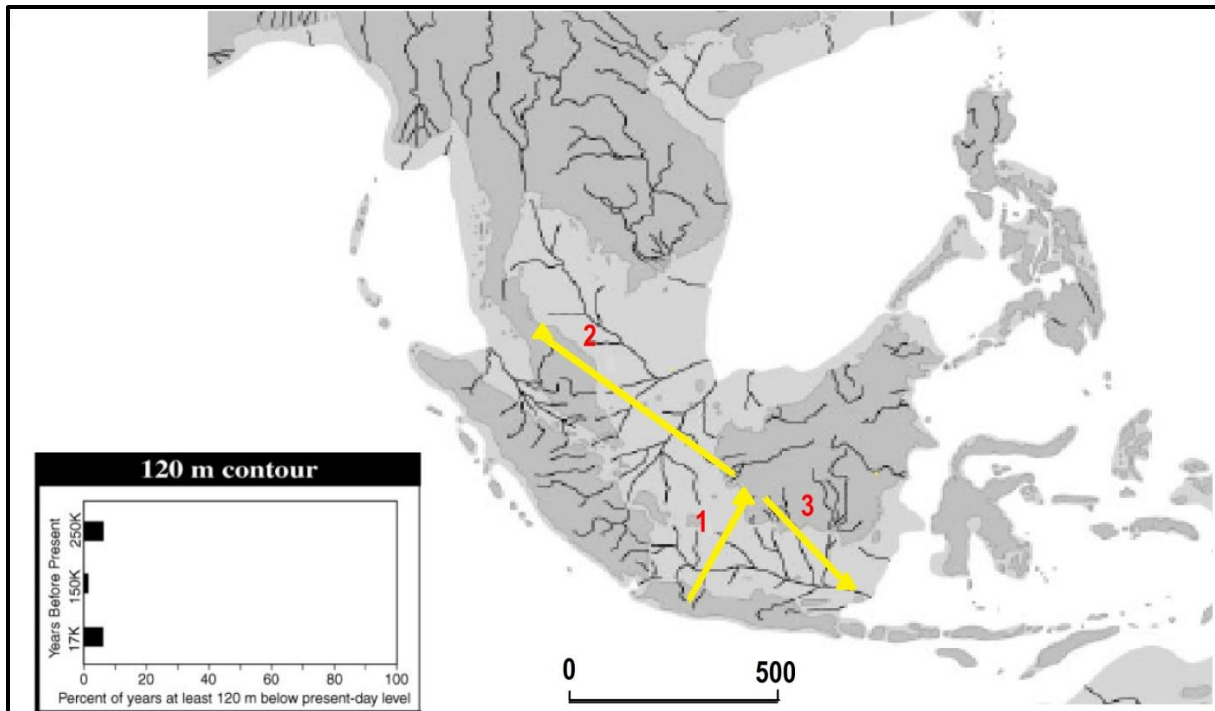
Persebaran *C. rhodostoma* diduga dimulai pada Pleistosen (1.8 sampai 0.8 juta tahun yang lalu), dimana pada *epoch* tersebut wilayah *Sundaland* mengalami fluktuasi penurunan level laut (*Glacial Maximum*). Pada *epoch* tersebut, periode regresi maksimum terjadi dalam waktu yang relatif singkat dan level air laut lebih tinggi dibandingkan saat ini (Voris, 2000). Woodruff (2003) memperkirakan bahwa rata-rata level air laut sekitar -60 m selama 800.000 tahun terakhir. Rata-rata tersebut merupakan kedalaman ketika Paparan Sunda muncul. Adanya fluktuasi air laut ini memberikan dampak terhubungnya pulau-pulau di *Sundaland* yang sebelumnya terpisah, sehingga organisme akuatik dan terestrial pada *epoch Pleistocene*

mengalami perubahan pola persebarannya (Voris, 2000). Estimasi ini juga didukung dengan angka jarak genetis yang rendah (0.29 - 0.39%) antar masing-masing populasi, dimana laju substitusi pada tiap basa nukleotida DNA mitokondria gen ND4 pada reptil adalah 2×10^{-9} (Eo dan Andrew, 2010). Arah persebaran *C. rhodostoma* diduga diawali dari populasi Jawa yang menyebar ke Kalimantan. Populasi Kalimantan mulai berkembang dan mengalami persebaran menuju populasi Thailand dan populasi Kangean.



Gambar 17. Waktu divergensi ular *C. rhodostoma* yang dikonstruksi menggunakan *relaxed normal clock Bayesian* dengan 95% *credible interval*.

Keterangan: angka menunjukkan waktu pemisahan (juta tahun yang lalu).



Gambar 18. Arah persebaran *C. rhodostoma* di Indonesia dan sekitarnya.

Keterangan: Angka di peta menunjukkan arah persebaran spesies *C. rhodostoma*: 1. Populasi Jawa menuju Kalimantan; 2. Populasi Kalimantan berkembang menuju Thailand; 3. Populasi Kalimantan berkembang menuju Kangean.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, beberapa kesimpulan yang dapat diambil adalah:

1. Hubungan kekerabatan intra-spesies ular *C. rhodostoma* di Indonesia menunjukkan bahwa antar masing-masing populasi yang diteliti masih dalam satu spesies, hal ini didukung dengan angka ambang batas (nilai *p-distance*) ND4 populasi intra-spesies tertinggi 0.39% dan terendah 0.29% (tergolong rendah) dan bentuk topografi pohon filogenetik yang politomi.
2. Divergensi *C. rhodostoma* diduga terjadi pada Pleistosen (1,5 juta tahun yang lalu), dimana populasi berkembang diawali dari populasi Jawa, menuju Kalimantan, Thailand, dan Kangean. Pola persebaran ular *C. rhodostoma* diperkirakan sebagai akibat dari periode *glacial maximum* yang terjadi selama Pleistosen.

2.2 Saran

Terkait pengelompokan *C. rhodostoma* yang politomi, diperlukan konfirmasi ulang melalui pendekatan marker yang lain, termasuk DNA inti (Nukleus) dan DNA Mitokondria.

DAFTAR PUSTAKA

- Akani, G.C., N. Ebere, L. Luiselli dan E.A. Eniang. 2007. Community Structure and Ecology of Snakes in Fields of Oil Palm Trees (*Elaeis guineensis*) in the Niger Delta, Southern Nigeria. *Afr. J. Ecol.* 46: 500-506.
- Alencar, Laura R.V., Tiago B. Quental, Felipe G. Grazziotin, Michael L. Alfaro, Marcio Martins, Mericien Venzon, Hussam Zaher. 2016. Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 105: 50–62
- Ali, J. R. dan Aitchison J. C. 2008. Gondwana to Asia: plate tectonics, paleogeography and the biological connectivity of the Indian sub-continent from the Middle Jurassic through latest Eocene (166-35 Ma). *Earth-Sci. Rev.* 88:145-166
- Al-Samarai, F.R., Abdulkareem, dan A. Al-Kazaz. 2015. Molecular Markers: an Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology.* 9: 3.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, dan D.J. Lipman. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215(3): 403-410.
- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H.L. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden, dan I.G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Avise, J.C. 1994. **Molecular markers, natural history and evolution.** Chapman and Hall: New York.
- Avise, J.C. 1998. The History and Purview of Phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology.* 7: 371-379.
- Becak, M.L., W. Becak, dan F.L. Roberts. 1973. **Fish, amphibians, reptiles and birds.** Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
- Bergman, R.A.M. 1961. The anatomy of some Viperidae (III), *Ancistrodon rhodostoma*. *Acta Morphologica Neerlando-Scandinavica.* 4: 212-230.
- Bitgood, J.J., R.N. Shoffner. 1990. Cytology and cytogenetics. *Poult breeding Genet.* 22: 401–427.

- Boulenger, G.A. 1896. Catalogue of the snakes in the British Museum, Vol. 3. London (Taylor & Francis), xiv + 727 pp
- Bulian, J. 2003. Notizen zu einem Gelage von *Calloselasma rhodostoma* (Boie, 1827). *Sauria*. 25: 17-19.
- Buvanendran, V., dan D.J. Finney. 1967. Linkage relationships of egg albumen loci in the domestic fowl. *Br Poult Sci*. 8: 9–13.
- Cardini, A., D. Nagorsen, P. O'Higgins, P.D. Polly, R.W. Thorington, dan P. Tongiorgi. 2009. Detecting biological distinctiveness using geometric morphometrics: an example case from the Vancouver Island marmot. *Ethology Ecology & Evolution*. 21: 209-223.
- Case, J. T. dan D. C. Wallace. 1981. Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts. *Somat.Cell Genet*. 7: 103-108.
- Chanhome, L., P. Jintakune, H. Wilde, dan M.J. Cox. 2001. Venomous snake husbandry in Thailand. *Wilderness and Environmental Medicine*. 12: 17-23.
- Claude, J., E. Paradis, H. Tong, dan A. Jean-Christophe. 2003. Geometric morphometric assessment of the effects of environment and cladogenesis on the evolution of the turtle shell. *Biological Journal of the Linnean Society*. 79: 485-501.
- Daltry, J.C. 1995. The evolutionary biology of the Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*: a study of the causes of intraspecific variation. Unpubl.Ph.D. Diss., Univ. Aberdeen, United Kingdom.
- Daltry, J.C., W. Wuster, dan R.S. Thorpe. 1996. Diet and snake venom evolution. *Nature*. 379: 537-540.
- Daltry, J.C., W. Wuster, dan R.S. Thorpe. 1998. Intraspecific Variation in the Feeding Ecology of the Crotaline Snake *Calloselasma rhodostoma* in Southeast Asia. *Journal of Herpetology*. 32(2): 198-205.
- Das, I. 2010. **A Field Guide to the Reptiles of South-East Asia**. New Holland Publishers: UK.
- Das, I. 2012. **A Naturalist's Guide to the Snakes of South-East Asia Malaysia, Singapore, Thailand, Myanmar, Borneo, Sumatra, Java and Bali**. John Beaufoy Publishing: United Kingdom.
- David, P. dan G. Vogel. 2009. A New Species of the Natricine Snake Genus *Amphiesma* from Borneo (Squamata: Natricidae). *Russian Journal of Herpetology*. 17(2): 121–127.

- DeYoung, R.W., dan R.L. Honeycutt. 2005. The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *J Wildl Manage.* 69: 1362–1384.
- Dowling, H. G. 1951d. A proposed standard system of counting ventrals in snakes. *British Journal of Herpetology* 1:97–99
- Drinkwater, R.D., dan D.J.S. Hetzel. 1991. Application of molecular biology to understanding genotype-environment interactions in livestock production. In *Proc. of an International Symposium on Nuclear Techniques in Animal Production and Health*. Vienna: IAEA, FAO; 437– 452. 15–19 April.
- Drummond, A.J. dan A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC evolutionary biology, 7(1), p.214.<http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-7-214>. Diakses 13 Januari 2018.
- Drummond, A.J., S.Y. Ho, M.J. Phillips, dan A. Rambaut. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 4: e88.
- Duvall, D., G.W. Schuett, dan S.J. Arnold. 1993. Ecology and evolution of snake mating systems. In: *Snakes, Ecology and Behavior* (Ed. by R. A. Seigel & J. T. Collins), pp. 165–200. New York: McGraw-Hill.
- Eo, Soo Hyung dan J. Andrew DeWoody. 2010. Evolutionary rates of mitochondrial genomes correspond to diversification rates and to contemporary species richness in birds and reptiles. *Proc. R. Soc. B.* 277, 3587-3592.
- Ford, N.B. dan R.A. Seigel. 1989. Relationships among body size, clutch size, and egg size in three species of oviparous snakes. *Herpetologica.* 45: 75–83.
- Futuyama, D.J. 2005. **Evolution**. Sinauer Associate, Inc.: Massachussets.
- Geyh, M.A., H.R. Kudrass, dan H. Streif. 1979. Sea-level changes during the late Pleistocene and Holocene in the Straits of Malacca. *Nature.* 278: 441-443.
- Giles, R.E., H. Blanc, H.M. Cann, dan D.C. Wallace. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77: 6715-6719.
- Gizaw, S., J.A.M. Van Arendonk, H. Komen, J.J. Windig, dan O. Hanotte. 2007. Population structure, genetic variation and morphological diversity in indigenous sheep of Ethiopia. *Anim Genet.* 38: 621–628.

- Gloyd, H.K. dan R. Conant. 1990. Snakes of the *Agkistrodon* Complex: A Monographic Review. Society for the Study of Reptiles and Amphibians. Contributions to Herpetology 6: Saint Louis, MO, USA.
- Gorog, A. J., Sinaga M. H., Engstrom M. D. 2004. Vicariance or dispersal? Historical biogeography of three Sunda shelf murine rodents (*Maxomys surifer*, *Leopoldamys sabanus* and *Maxomys whiteheadi*). *Biol. J. Linn. Soc.* 81:91–109
- Grismer, L. dan T. Chan-Ard. 2012. *Calloselasma rhodostoma*. The IUCN Red List of Threatened Species 2012: e. T192168A2050205. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN. UK. 2012-1.RLTS.T192168A2050205.en>.
- Hall, R. 1996. Reconstructing Cenozoic SE Asia. In: R. Hall and D.J. Blundell (eds.), Tectonic evolution of SE Asia. *Geol. Soc. Spec. Publ.* 106:153-184.
- Hall, R. 2002. Cenozoic geological and plate tectonic evolution of SE Asia and the SW Pacific: computer-based reconstructions, model and animations. *Journal of Asian Earth Sciences*, 20, 353-434.
- Hall, R. 2009. Southeast Asia's changing palaeogeography. *Blumea* 54:148–61
- Hall, R. 2013. The palaeogeography of Sundaland and Wallacea since the Late Jurassic. *J. Limnol.* 72(S2): 1-17.
- Hall, Robert. 2013. The palaeogeography of Sundaland and Wallacea since the Late Jurassic. *J. Limnol.*, 72(s2): 1-17
- Hamidy, A. 2006. Headscalation in *Naja sputatrix* Boie, 1827—discussion on the presence of a small accessory scale. *Hamadryad.* 31(2).
- Hanebuth, T., K. Stattegger, dan P.M. Grootes. 2000. Rapid Flooding of the Sunda Shelf: A Late-Glacial Sea-Level Record. *Science.* 288(5468): 1033-1035.
- Hasegawa, M., H. Kishino, dan T. Yano. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160–174.
- Heaney L. R. 1991. A synopsis of climatic and vegetational change in Southeast Asia. *Clim. Change*, 19:53–61
- Hesp, P.A., C.C. Hung, M. Hilton, C.L. Ming, dan I.M. Turner. 1998. A first tentative Holocene sea-level curve for Singapore. *Journal of Coastal Research.* 14: 308-314.

- Hill, III., G. Jacques, L. Chanhom, T. Artchawakom, K. Thirakhupt, H.K. Voris. 2006. Nest Attendance by a Female Malayan Pit Viper (*Calloselasma rhodostoma*) in Northeast Thailand. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*. 6(2): 57-66.
- Hoser, R.T. 2018. A Sensible Breakup of the South-East Asian PitViper Genus *Calloselasma rhodostoma* Cope, 1860 *Sensu lato* and the Description of a New Species. *Australasian Journal of Herpetology*. 36: 21-23.
- Huang, T.F., C.Z. Liu, dan S.H. Yang. 1995. Aggretin, a novel platelet-aggregation inducer from swsnake (*Calloselasma rhodostoma*) venom, activates phospholipase C by acting as a glycoprotein Ia/IIa agonist. *Biochemical Journal*. 309(3): 1021-1027.
- Huelsenbeck, J.P. dan Ronquist, F. 2001. MRBAYES Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754-755.
- Inger, R.F. dan H.K. Voris. 2001. The biographical relations of the frogs and snakes of Sundaland. *Journal of Biogeography*. 28: 863-891.
- Iskandar, D.T. dan W.R. Erdelen. 2016. Conservation of amphibians and reptiles in Indonesia: issues and problems. *Amphibian and Reptile Conservation*. 4(1): 60-87.
- IUCN. 2018. The IUCN Red List of Threatened Species™: *Calloselasma rhodostoma*. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012-1.RLTS.T192168A2050205.en>
- Jonker, J., G. Meurs, dan H. Balner. 1982. Typing for RhLA-D in rhesus monkeys: II genetics of the D antigens and their association with DR antigens in a population of unrelated animals. *Tissue Antigens*. 19: 69-78.
- Kaliontzopoulou, A., M.A. Carretero, dan G.A. Llorente. 2007. Multivariate and geometric morphometrics in the analysis of sexual dimorphism variation in Podarcis lizards. *Journal of Morphology*. 268: 152-165.
- Koch, F. 1991. Experiences in keeping and breeding the Malayan moccasin viper, *Calloselasma rhodostoma* (Boie 1827). *Sauria*. 1: 17-21.
- Kopstein, F. 1938. Eirkunde der Malaiischen Reptilien. Bulletin of the Raffles Museum and Library, 14: 81-167.
- Krause MA, Burghardt GM, Gillingham JC.Body. 2003. Size plasticity and local variation of relative head and body size sexual dimorphism in garter snakes (*Thamnophis sirtalis*). *J Zool*; 261:399-407.

- Kumar, S., G. Stecher, dan K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7): 1870-1874.
- Kurniawan, N., R.A. Driyana, D.S. Nahari, A.S. Firdaus. 2015. Speciation and Zoogeography of Amphibian in Sundaland. *Journal of Biological Research*. 21(1).
- Leaché, A.D., M.S. Koo, C.L. Spencer, T.J. Papenfuss, R.N. Fisher, J.A. McGuire. 2009. Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coasthorned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106: 12418–12423.
- Lemey, P., M. Salemi, dan A. Vandamme. 2009. **The phylogenetic handbook - A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing**. Cambridge University Press: Cambridge.
- Lohman, D.J., dkk., 2011. Biogeography of the Indo-Australian Archipelago. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 42(1): 205–226.
- Lohman, David J., Mark de Bruyn, Timothy Page, Kristina von Rintelen, Robert Hall, Peter K.L. Ng, Hsi-Te Shih, Gary R. Carvalho, Thomas von Rintelen. 2011. Biogeography of the Indo-Australian Archipelago. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 42:205–26
- Louys, J. dan E. Meijaard. 2010. Palaeoecology of Southeast Asian megafauna-bearing sites from the Pleistocene and a review of environmental changes in the region. *Journal of Biogeography*. 37(8): 1432–1449.
- Lynch, J. D. 2015. The role of plantations of the African palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in the conservation of snakes in Colombia. *Caldasia*, 37(1), 169-182.
- Madsen, T. dan Shine, R. 1993. Temporal variability in sexual selection acting on reproductive tactics and body size in male snakes. *American Naturalist*, 141, 167–171
- Malhotra, A. dan R.S. Thorpe. 2004. Maximizing information in systematic revisions: a combined molecular and morphological analysis of a cryptic green pitviper complex (*Trimeresurus stejnegeri*). *Biological Journal of the Linnean Society*. 82: 219-235.
- Malhotra, A., R.S. Thorpe, Mrinalini, dan B.L. Stuart. 2011. Two new species of pitviper of the genus *Cryptelytrops* Cope 1860 (Squamata: Viperidae: Crotalinae) from Southeast Asia. *Zootaxa*. 2757: 1-23.
- Matsui, M. dan K. Nishikawa. 2014. Description of a new species of *Limnonectes* from Sarawak,

- Malaysian Borneo (Dicroglossidae, Anura). *Current Herpetology*. 33: 135–147.
- Matsui, M., K. Nishikawa, dan K. Eto. 2014. A new burrow-utilizing fanged frog from Sarawak, East Malaysia (Anura: Dicroglossidae). *Raffles Bulletin of Zoology*. 62: 629–687.
- Mayr, E. 1942. **Systematics and the origin of species, from the view point of a zoologist**. Harvard University Press: Cambridge, MA.
- Mayr, E. 1944. Wallace's Line in the Light of Recent Zoogeographic Studies. *The Quarterly Review of Biology*. 19(1): 1.
- Mayr, E. dan P.D. Ashlock. 1991. **Principles of Systematics Zoology**. McGraw Hill International Edition: Singapore.
- McDiarmid, R.W., J.A. Campbell, dan T.A. Toure. 1999. Snake species of the world: a taxonomic and geographical reference, Vol 1. The Herpetologists' League, Washington, DC.
- Mindell, D.P. dan R.L. Honeycutt. 1990. Ribosomal RNA in Vertebrates: Evolution and Phylogenetic Applications. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 21: 541-566.
- Mittermeier, R.A., N. Myers, dan C.G. Mittermeier. 1999. Hotspots: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. *Journal of Mammalogy*. 83(2): 630-633.
- Molengraaff, G.A.F., Weber M. 1921. On the relation between the Pleistocene glacial period and the origin of the Sunda Sea (Java and South China Sea), and its influence on the distribution of coral reefs and on the land and freshwater fauna. K. Ned. *Akad. van Wet. Verhan.* 23:395–439
- Molengraaff, G.A.F. 1916. Het problem der koraaeilanden en de isostasie. *Verslagen der Afdeling Natuurkunde der Koninklijke Akademie van Wetenschappen*. 25: 1-217.
- Morley R. J. 2000. Origin and Evolution of Tropical Rain Forests. Chichester, UK: John Wiley & Sons. 362 pp.
- Morley, R. J. 2000. Origin and Evolution of Tropical Rain Forests. Chichester, UK: John Wiley & Sons. 362 pp.
- Muller, C.J., Wahlberg N., Beheregaray L.B. 2010. 'After Africa': the evolutionary history and systematics of the genus *Charaxes ochsenheimer* (Lepidoptera: Nymphalidae) in the Indo-Pacific region. *Biol. J. Linn. Soc.* 100:457–81
- Myers, N., R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A.B. da Fonseca, dan J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403(6772): 853-858.

- Nater, A., M.P. Mattle-Greminger, A. Nurcahyo, M.G. Nowak, M. de Manuel, T. Desai, C. Groves, M. Pybus, T.B. Sonay, C. Roos, A.R. Lameira, S.A. Wich, J. Askew, M. Davila-Ross, G. Fredriksson, G. de Valles, F. Casals, J. Prado-Martinez, B. Goossens, E.J. Verschoor, K.S. Warren, I. Singleton, D.A. Marques, J. Pamungkas, D. Perwitasari-Farajallah, P. Rianti, A. Tuuga, I.G. Gut, M. Gut, P. Orozco-terWengel, C.P. van Schaik, J. Bertranpetit, M. Anisimova, A. Scally, T. Marques-Bonet, E. Meijaard, dan M. Krutzen. 2017. Morphometric, Behavioral, and Genomic Evidence for a New Orangutan Species. *Current Biology*. 27: 3487–3498.
- Pauwels, O.S.G., L. Ong-Arj, P. David, R. Bour, P. Dangsee, C. Puangjit, dan C. Chimsunchart. 2000. Herpetological investigations in Phang-Nga Province, southern Peninsular Thailand, with a list of reptile species and notes on their biology. *Dumerillia*. 4(2): 123-154.
- Ponnudurai, G., M.C.M. Chung, dan N.H. Tan. 1994. Purification and Properties of the L-Amino Acid Oxidase from Malayan Pit Viper (*Calloselasma rhodostoma*) Venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 313(2).
- Pyron, R.A., F.T. Burbrink, dan J.J. Wiens. 2013. A phylogeny and revised classification of squamata including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology*. 13:93.
- Rampino, M.R. dan S.H. Ambrose. 2000. Volcanic winter in the Garden of Eden: the Toba super-eruption and the Late Pleistocene human population crash. In: McCoy, F.W., G. Heiken, editors. Volcanic hazards and disasters in human antiquity. Boulder (CO): *Geological Society of America*. p. 71-82.
- Ruane, S. 2015. Using geometric morphometrics for integrative taxonomy: an examination of head shapes of milk snakes (genus *Lampropeltis*). *Zoological Journal of the Linnean Society*.
- Sayyari, E. dan S. Mirarab. 2018. Testing for Polytomies in Phylogenetic Species Trees Using Quartet Frequences. *Genes*. 9: 132.
- Schuett, G.W. 1984. *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper). Feeding mimicry. *Herpetol. Rev.* 15: 112.
- Shine, R. 1993. Sexual dimorphisme. In Snakes: ecology and behavior (ed. R. Seigel & J. Collins), pp. 49-86. New York: Mc. Graw-Hill.
- Shine, R., Olsson, M. M., I. T., Le Master, M. O. dan Mason, R. T. 1999. Body Size enhances mating success in male gartersnakes. *Anim. Behav* (In the press.)

- Singh, B.N. 2012. Concept of species and modes of speciation. *Current Science*. 103(7).
- Solihuddin, T. 2014. A drowning sunda shelf model during last glacial maksimum (LGM) and Holocene: A Review. *Indonesian Journal on Geoscience*. 1(2).
- Stayton, C.T. 2005. Morphological evolution of the lizard skull: a geometric morphometrics survey. *Journal of Morphology*. 263: 47–59.
- Stuart, B.L. dan D.A. Emmett. 2006a. A Collection of Amphibians and Reptiles from the Cardamom Mountains, Southwestern Cambodia., *Fieldiana: Zoology*, N. S., No. 109, PP. 1-27.
- Stuart, B.L., K. Sok dan T. Neang. 2006b. A Collection of Amphibians and Reptiles from Hilly Eastern Cambodia. *The Raffles Bulletin of Zoology*. 54(1): 129-155.
- Swofford, D.L., G.J. Olsen, P.J. Waddell, dan D.M. Hillis. 1996. Phylogenetic inference. In Hillis DM, Moritz D, and Mable BK, editors, *Molecular Systematics*, pp. 407-514. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Sworder, G.H. 1933. Notes on some Reptiles from the Malay Peninsula.
- Taylor, E.H. 1965. The serpents of Thailand and adjacent waters. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 45(9): 609-1096
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, dan T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple; sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22(22): 4673-4680.
- Tjia, H.D. 1996. Sea-level changes in the tectonically stable Malay-Thai Peninsula. *Quaternary International*. 31(0): 95-101.
- Tweedie, M.W.F. 1983. **The snake of malaya**. Singapore National Printers: Singapore.
- Uetz, P. dan J. Hillermann. 2018. Reptile Database. <http://www.reptile-database.org/db-info/taxa.html#Ser>.
- van Wezel, I.L., dan R.J. Rodgers. 1996. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol Reprod*. 55: 1003–1011.
- Vogel, G., P. David, dan I. Sidik. 2014. On *Trimeresurus sumatranus* (Raffles, 1822), with the designation of a neotype and the description of a new species of pitviper from Sumatra (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Amphibian & Reptile Conservation*. 8(2): 1–29.

- Vogel, G., P. David, dan O.S.G. Pauwels. 2004. A review of morphological variation in *Trimeresurus popeiorum* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae), with the description of two new species. *Zootaxa* 727: 1–63.
- Vogel, Gernot, Patrick David, Mario Lutz, Johan Van Rooijen & Nicolas Vidal. 2007. Revision of the *Tropidolaemus wagleri*-complex (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). I. Definition of included taxa and redescription of *Tropidolaemus wagleri* (Boie, 1827). *Zootaxa* 1644: 1–40
- Voris, H.K. 2000. Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river system and time durations. *Journal of Biogeography*. 27: 1153–1167.
- Wallace, D.C., M.T. Lott, A. Torroni, M.D. Brown, dan J.M. Shoffner. 1994. Report of the committee on human mitochondrial DNA. In: Cuticchia, A. J., Pearson, P. L. (eds.): Human Gene Mapping, 1993: A Compendium. Johns Hopkins Univ. Press: Baltimore.
- Wan Q.H., H. Wu, T. Fujihara, dan S.G. Fang. 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue?. *Electrophoresis*. 25: 2165–2176.
- Warrell, D.A. 1986. Tropical snake bite: clinical studies in Southeast Asia. In J. B. Harris (ed.), Natural Toxins-Animal, Plant and Microbial, Clarendon Press, Oxford, pp. 25–45.
- White, M.J.D. 1978. **Modes of Speciation**. W.H. Freeman and Company: San Francisco.
- Wilting, A. 2012. Mentawai's endemic, relictual fauna: Is it evidence for Pleistocene extinctions on Sumatra? *Journal of Biogeography*. 39(9): 1608–1620.
- Woodruff, D. 2010. Biogeography and conservation in Southeast Asia: how 2.7 million years of repeated environmental fluctuations affect today's patterns and the future of the remaining refugial-phase biodiversity. *Biodivers. Conserv.* 19:919–41
- Woodruff, D.S. 2003. Neogene marine transgressions, palaeogeography and biogeographic transitions on the Thai–Malay Peninsula. *J. Biogeogr.* 30, 551–567.
- Wostl, E., I. Sidik, W. Trilaksono, K.J. Shaney, N. Kurniawan, dan E.N. Smith. 2016. Taxonomic Status of the Sumatran Pitviper *Trimeresurus (Popeia) toba* David, Petri, Vogel & Doria, 2009 (Squamata: Viperidae) and other Sunda Shelf Species of the Subgenus *Popeia*. *Journal of Herpetology*. 50(4): 633–641.
- Wüster, W., L. Peppin, C.E. Pook, dan D.E. Walker. 2008. A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49: 445–459.

- Wüster, W., Otsuka, S., Malhotra, A., Thorpe, R.S. 1992. Population systematics of Russell's viper: a multivariate study. *Biol. J. Linn. Soc.* 47, 97–113.
- Yang, W., X. Kang, Q. Yang, Y. Lin, dan M. Fang. 2013. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *J Anim Sci Bio.* 4(2): 1–6.
- York, D.S. 1983. Agonistic and reproductive behaviors in the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). Unpubl. M.S. Thesis, Univ. Tennessee, Knoxville.
- Zachos, J., Pagani M., Sloan L., Thomas E., Billups K. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292:686–93
- Zelditch, M.L., D.L. Swiderski, H.D. Sheets. 2012. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Academic Press: New York.